

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE FIDALGO RIBEIRO

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DA DEUBIQUITINASE USP2a

CURITIBA

2016

CAROLINE FIDALGO RIBEIRO

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DA DEUBIQUITINASE USP2a

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em ciências biológicas.

Orientador: Profº Dr Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2016

Ribeiro, Caroline Fidalgo

Caracterização bioquímica e funcional da deubiquitinase USP2a. /
Caroline Fidalgo Ribeiro. – Curitiba, 2016.
85 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Silvio Marques Zanata

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia.

1. Enzimas 2. Proteases Específicas de Ubiquitina 3. Neoplasias da
próstata I. Título II. Zanata, Silvio Marques III. Universidade Federal do
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 576



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DA DEUBIQUITINASE USP2a”

por

CAROLINE FIDALGO RIBEIRO

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

Prof. Dr. Silvio Marques Zanata – Presidente

Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro

Profa. Dra. Danielle Malheiros Ferreira

Profa. Dra. Sheila Maria B. Winnischofer

Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha

Curitiba, 29 de agosto de 2016.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Jonas e Concepcion, e à minha querida irmã, Fernanda, por todo o amor, carinho, incentivo e apoio.

Ao meu orientador, professor Dr. Silvio Zanata, pelos ensinamentos, pela oportunidade e pela atenção nesses 7 anos de orientação, desde a iniciação científica até aqui.

Ao meu orientador do Dana Farber Cancer Institute/Harvard Medical School, Dr. Massimo Loda, pela incrível oportunidade, pelos ensinamentos, por me receber tão bem em seu laboratório e disponibilizar todo tipo de recurso para que eu pudesse desenvolver meu projeto da melhor maneira possível.

À Zaine, Ingrid, Luiz, Larissa, Roberta, Camila, Karime, Silvinha, Max e todos meus queridos amigos do laboratório de Neurobiologia, por deixarem os dias e os experimentos mais agradáveis.

À minha eterna mãe científica Michele, que mesmo longe está sempre por perto e ajudando, tanto na vida pessoal quanto na profissional.

À Graci, pela amizade e pela ajuda em experimentos, estudos e trabalhos desde a época do mestrado até aqui, e a todos os amigos do laboratório de Epigenética e Câncer.

À Débora, uma das pessoas mais inteligentes e dedicadas que já conheci, por ser uma excelente companheira de bancada, de viagens, de brunches e de passeios em Boston.

À Giorgia, Jessica, Sudeepa, Radha, Cornelia, e todos os amigos do Loda Lab, por me receberem tão bem e por toda a ajuda, dentro e fora do laboratório.

À Universidade Federal do Paraná, essa instituição notável onde completo quase 13 anos de estudo: ensino médio, graduação, mestrado e doutorado.

Ao CNPq, que através da chamada específica CNPq-MIT-Harvard financiou a iniciativa colaborativa bilateral UFPR-Dana Farber Cancer Institute, permitindo que eu desenvolvesse parte desse trabalho no laboratório do Dr. Massimo Loda.

A CAPES e ao programa de pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

“Grau, theurer Freund, ist alle Theorie,
Und grün des Lebens goldner Baum.“
(GOETHE, Johann Wolfgang von.
In: __, Faust, 1808)

RESUMO

USP2a é uma importante enzima deubiquitinase (DUB) capaz de remover a ubiquitina de diferentes substratos, como da enzima FASN e do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR). Em tumores de próstata observa-se uma correlação positiva entre a expressão de USP2a e a tumorigênese, caracterizando-a como uma proteína oncogênica. Essa característica da DUB está principalmente relacionada com sua função estabilizadora da enzima FASN, responsável pela síntese de ácidos graxos na célula. A USP2a também resgata o EGFR da degradação, mantendo seus níveis celulares elevados. Sabe-se que o direcionamento de proteínas da membrana plasmática para a via do corpo multivesicular requer a ação dos complexos proteicos ESCRTs. Um deles, o ESCRT-0, possui duas subunidades: Hrs, responsável por direcionar o complexo aos endossomos precoces, e a subunidade STAM, capaz de interagir com diferentes DUBs. Sabe-se que a USP2a co-localiza com EEA1, um marcador de endossomos precoces, então decidiu-se analisar se a USP2a interage também com STAM, e identificar o sítio dessa interação. Para isso, linhagens celulares normais e tumorais de próstata foram modificadas para expressar permanentemente a forma selvagem e o mutante cataliticamente inativo de USP2a, e também foram silenciadas para a expressão de STAM. As sequências de STAM, de sua região SH3 e do mutante STAM Δ SH3 foram clonadas, com o intuito de se obter plasmídeos de superexpressão para esses construtos. A primeira evidência de interação entre USP2a e STAM foi observada em ensaio de co-imunoprecipitação com células tumorais de próstata superexpressando USP2a, mas esse resultado ainda não foi totalmente confirmado. A região de STAM que pode contribuir para essa interação não foi identificada devido a baixos níveis de expressão dos construtos. Uma relação indireta entre USP2a e STAM foi observada, com o aumento da ubiquitinação de STAM com a superexpressão da forma selvagem da enzima em células de próstata, sem alterar os níveis celulares da proteína. Observou-se também que STAM é capaz de modular a reciclagem de EGFR em linhagens celulares de próstata, uma vez que seu silenciamento aumenta a taxa de degradação de EGFR. Analisou-se também o efeito fenotípico da deleção do gene *fasn* em camundongos com tumores de próstata induzidos pela perda de Pten. Verificou-se que a inibição genética de FASN reduz a incidência de formas agressivas de tumores de próstata nos animais. Os resultados obtidos sugerem que FASN, assim como USP2a, pode ser um importante alvo farmacológico para o tratamento de tumores de próstata.

Palavras-chave: USP2a. ESCRT-0. STAM. EGFR. FASN.

ABSTRACT

USP2a is an important deubiquitinating enzyme (DUB) capable of removing ubiquitin from different substrate proteins, like FASN and epidermal growth factor receptor (EGFR). In prostate tumors there is a positive correlation between USP2a expression level and tumorigenesis, which makes it an oncogenic protein. This characteristic is mainly related with its ability to stabilize FASN, the enzyme that synthesizes fatty acids in cells. USP2a also rescues EGFR from lysosomal degradation, keeping its cellular levels raised. It's known that sorting of plasma membrane proteins into multivesicular body pathway requires the ESCRTs complexes. One of these, the ESCRT-0, has two subunits: the subunit Hrs, that is responsible for targeting the complex to early endosome, and the subunit STAM, which interacts with different DUBs. It's known that USP2a co-localizes with EEA1, a marker of early endosomes, so we decided to analyze if USP2a also interacts with STAM, whether this interaction is needed to taking USP2a to early endosome and identify the protein site required for this interaction. For this, normal and tumoral prostate cell lines were modified to permanently overexpress USP2a wild type and its catalytically inactive mutant, these cell lines also had the STAM expression knocked down. Molecular cloning of STAM, its SH3 region and a mutant lacking SH3, all tagged with GFP, were performed in order to obtain plasmids for overexpression of this constructs. The first sign of interaction between USP2a and STAM was observed with a co-immunoprecipitation assay in prostate tumoral cells overexpressing USP2a, but it was not fully confirmed. The region of STAM that might contribute to the interaction wasn't identified due to low expression of the constructs. Indirect relationship between USP2a and STAM was observed, since overexpression of wild type USP2a is related with enhanced ubiquitination of STAM in prostate cell lines, even though the protein level remains the same. STAM is also capable of affect EGFR recycling in prostate cell lines, since STAM knocked down cells shown enhanced degradation of EGFR. It was also analyzed the effect of *fasn* gene deletion on Pten loss driven prostate tumors. The genetic ablation of FASN reduced the incidence of aggressive prostate tumors in mice, suggesting that FASN, as well as USP2a, could be an important pharmacological target for treatment of prostate cancer.

Key words: USP2a. ESCRT-0. STAM. EGFR. FASN.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	AS TRÊS ETAPAS DO PROCESSO DE UBIQUITINAÇÃO	20
FIGURA 2	ENVOLVIMENTO DOS ESCRTs NA ENDOCITOSE DE PROTEÍNAS	28
FIGURA 3	CLONAGEM E EXPRESSÃO DE USP2a6His	51
FIGURA 4	ANÁLISE DO LISADO DE CÉLULAS BACTERIANAS EXPRESSANDO USP2a6His.....	52
FIGURA 5	OBTENÇÃO DE ANTICORPOS REATIVOS A USP2a.....	54
FIGURA 6	EXPRESSÃO DE STAM EM DIFERENTES CÉLULAS	55
FIGURA 7	SUPEREXPRESSÃO DE USP2aHA EM LINHAGEM CELULAR DE PRÓSTATA.....	56
FIGURA 8	CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA STAM	58
FIGURA 9	SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO DE STAM EM LINHAGEM CELULAR DE PRÓSTATA.....	59
FIGURA 10	PULL-DOWN COM USP2a6HIS E EXTRATO DE CÉLULAS HeLa	61
FIGURA 11	ISOLAMENTO DE ENDOSSOMOS PRECOCES E TARDIOS	62
FIGURA 12	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA USP2a HUMANA.....	63
FIGURA 13	CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO DE STAM EM LINHAGEM CELULAR DE PRÓSTATA COM SUPEREXPRESSÃO TRANSIENTE DE USP2a	64
FIGURA 14	CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO DE STAM EM LINHAGEM CELULAR DE PRÓSTATA COM SUPEREXPRESSÃO PERMANENTE DE USP2a	65
FIGURA 15	EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE USP2a SOBRE A PROTEÍNA STAM	67
FIGURA 16	RECICLAGEM DE EGFR EM CÉLULAS SILENCIADAS PARA STAM....	68
FIGURA 17	MASSA E VOLUME DE PROSTATA DE CAMUNDONGOS KO PARA FASN, PTEN E FASN/PTEN.....	70
FIGURA 18	ANÁLISE HISTOLÓGICA DE PRÓSTATA DE CAMUNDONGOS KO PARA FASN, PTEN E FASN/PTEN	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ANTICORPOS E DILUIÇÕES UTILIZADOS	37
TABELA 2 – EFICIÊNCIA DO KO DE FASN E PTEN EM PRÓSTATA DE CAMUNDONGOS	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMSH	– Associated Molecule with SH3 Domain of STAM
ATCC	– American Type Culture Collection
BSA	– Bovine Serum Albumin
CDK	– Cyclin-dependent Kinases
cDNA	– Complementar DNA
Da	– Dalton
D.O.	– Densidade óptica
DMEM	– Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DUB	– Deubiquitinating Enzyme
<i>E. coli</i>	– <i>Escherichia coli</i>
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEA1	– Early Endosome Antigen 1
EGF	– Epidermal Growth Factor
EGFR	– Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	– Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESCRT	– Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EV	– Empty Vector
FASN	– Fatty Acid Synthase
GFP	– Green Fluorescent Protein
H&E	– Coloração Hematoxilina-Eosina
HAT	– Meio de cultivo celular contendo hipoxantina, aminopterina e timidina
Hbp	– Hrs-binding protein
HG-PIN	– High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia
HPRT	– Hipoxantina Fosforribosil Transferase
HRP	– Horseradish Peroxidase

Hrs	– Hepatocyte Growth Factor-Regulated Tyrosine Kinase Substrate
HT	– Meio de cultivo celular contendo hipoxantina e timidina
Ig	– Imunoglobulina
IMAC	– Cromatografia de Afinidade a Metal Imobilizado
IPTG	– Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
ITAM	– Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif
KO	– Gene Knockout
Mdm2	– Murine Doble Minute 2
Mdm4/X	– Murine Doble Minute 4/X
Meio LB	– Meio Luria-Bertani
MIBC	– Muscle Invasive Bladder Cancer
mRNA	– RNA mensageiro
MUT	– Mutante
MVB	– Multivesicular Body
NCBI	– National Center for Biotechnology Information
NEM	– N-Etilmaleimida
NMIBC	– Non-Muscle Invasive Bladder Cancer
Ni	– Níquel
NTA	– Ácido Nitrilotriacético
Pa	– Pascal (N/m^2)
pb	– Pares de bases nitrogenadas
PBS	– Phosphate Buffer Saline
PCa	– Prostate Cancer
PCR	– Polymerase Chain Reaction
PDGF	– Platelet-Derived Growth Factor
PEG	– Polietilenoglicol
PIN	– Prostatic Intraepithelial Neoplasia

PMSF	– Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PTEN	– Phosphatase and Tensin homolog
RNA	– Ácido Ribonucléico
RPMI	– Roswell Park Memorial Institute cell medium
RTK	– Receptor Tyrosine Kinase
RT-PCR	– Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS	– Dodecil sulfato de sódio
STAM	– Signal Transducing Adaptor Molecule
TBST	– Tampão salino Tris adicionado de Tween-20
siRNA	– Small Interfering RNA
shRNA	– Short hairpin RNA
UBPY	– Ubiquitin Isopeptidase Y
UIM	– Ubiquitin-Interacting Motif
USP	– Ubiquitin Specific Peptidase
USP2a	– Ubiquitin Specific Peptidase 2a
USP8	– Ubiquitin Specific Peptidase 8
WT	– Wild Type

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	CONTEXTO E PROBLEMA	15
1.2	OBJETIVOS	17
1.2.1	Objetivo geral	17
1.2.2	Objetivos Específicos	17
1.3	JUSTIFICATIVA	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	19
2.1	UBIQUITINAÇÃO E TRÁFEGO DE RECEPTORES	19
2.2	ENZIMAS DEUBIQUITINASES E A USP2a	21
2.3	USP2a E CÂNCER	23
2.3	COMPLEXOS PROTÉICOS ESCRTs	26
3.	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	CLONAGEM MOLECULAR DE USP2a6His	31
3.2	EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE USP2a6His	34
3.3	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS E MONOCLONAIS REATIVOS A USP2a	35
3.4	ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS DE PRÓSTATA COM SUPEREXPRESSÃO DE USP2aHA	40
3.5	CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO DE STAM E SEUS MUTANTES	42
3.6	SILENCIAMENTO DE STAM EM LINHAGENS CELULARES DE PRÓSTATA	46
3.7	IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS MOLECULARES DE USP2a	47
3.8	RECICLAGEM DE EGFR EM CÉLULAS SILENCIADAS PARA STAM	49
3.9	INIBIÇÃO GENÉTICA DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE (FASN)	49
4.	RESULTADOS	51
4.1.	CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE USP2a	51
4.2	OBTENÇÃO DE ANTICORPOS REATIVOS A USP2a	53
4.3	ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS DE PRÓSTATA COM SUPEREXPRESSÃO DE USP2a	55
4.4	CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO DE STAM E SEUS MUTANTES	57

4.5	SILENCIAMENTO DE STAM EM LINHAGENS CELULARES DE PRÓSTATA	59
4.6	IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS MOLECULARES DE USP2a	60
4.7	RECICLAGEM DE EGFR EM CÉLULAS SILENCIADAS PARA STAM	67
4.8	INIBIÇÃO GENÉTICA DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE (FASN)	69
5.	DISCUSSÃO	73
5.1.	CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE USP2a6His	73
5.2.	ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS DE PRÓSTATA COM SUPEREXPRESSÃO DE USP2a E SILENCIADAS PARA STAM	74
5.3	IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS MOLECULARES DE USP2a	75
5.4	RECICLAGEM DE EGFR EM CÉLULAS SILENCIADAS PARA STAM	77
5.5	INIBIÇÃO GENÉTICA DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE (FASN)	78
6.	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

A função de diversos receptores localizados na membrana plasmática é regulada pelo processo de endocitose. Receptores do tipo tirosina-quinase (RKTs), quando ativados na membrana plasmática, geralmente são internalizados através de vesículas recobertas por clatrina e então direcionados para endossomos precoces através de microdomínios de clatrina (SORKIN & VON ZASTROW, 2002). Assim, os receptores podem ser reciclados de volta para a membrana plasmática ou enviados para degradação nos lisossomos, processo este dependente da ubiquitinação do receptor (HAGLUND *et al.*, 2003; MOSESSON *et al.*, 2003). A ubiquitinação é uma modificação pós-traducional reversível comparável, em complexidade e função, à fosforilação. A conjugação de ubiquitina, uma proteína de baixa massa molecular e extremamente conservada entre diferentes espécies, a um substrato proteico ou a cadeias de ubiquitina (poliubiquitina) necessita da cooperação sequencial de três enzimas, E1, E2 e E3, sendo que a ubiquitina ligase (E3) reconhece o substrato e determina a especificidade de ubiquitinação (HERSHKO *et al.*, 1983).

A ubiquitinação dos receptores de membrana é o principal componente do mecanismo que regula o direcionamento intracelular destes receptores. A ubiquitina conjugada aos RTKs funciona como um sinal inicial de disparo que conduz os receptores para a maquinaria de direcionamento endosomal, ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) (HURLEY & EMR, 2006). O funcionamento aberrante deste mecanismo de regulação negativa dos RTKs resulta em formas constitutivamente ativas dos receptores e sinalização sustentada, fatores estes diretamente associados com a patogênese do câncer (BACHE *et al.*, 2004; POLO *et al.*, 2004).

Deubiquitinasas (DUBs) são enzimas que catalisam a desconjugação da ubiquitina, tanto de proteínas-alvo como de cadeias de poliubiquitina, e regulam negativamente a ubiquitinação. Entre estas DUBs está a protease ubiquitina-específica (USP), uma cisteína protease que medeia processos de deubiquitinação celular

(NIJMAN *et al.*, 2005; LOVE *et al.*, 2007). Enquanto muitos esforços têm sido feitos para o entendimento da função de diferentes E3s na ubiquitinação de RTKs (D'AZZO *et al.*, 2005), pouco se sabe sobre o papel de DUBs nesta via de sinalização.

Entre as enzimas deubiquitinases com importância em processos de patogênese encontra-se a USP2a, cujos substratos já identificados incluem importantes reguladores de processos celulares, como EGFR, Mdm2, Mdm4, Aurora A, Myc e FASN. Apesar de muitos trabalhos descreverem a USP2a como uma proteína oncogênica, há também estudos que mostram diminuição na expressão dessa enzima em tecidos tumorais quando comparados a tecidos normais, não havendo um consenso na literatura quanto à sua contribuição na sobrevivência de células tumorais. O seu envolvimento no desenvolvimento de tumores de próstata, porém, já é mais bem estabelecido, e os dados disponíveis na literatura convergem em caracterizar a USP2a como uma importante molécula moduladora positiva da carcinogênese. Além disso, sabe-se que a importância da USP2a nesse tipo de tumor relaciona-se principalmente com seu substrato, a FASN, uma enzima necessária à síntese de ácidos graxos na célula.

Além da FASN, outro importante substrato da USP2a é o EGFR. Recentemente foi demonstrado (LIU *et al.*, 2013) que a USP2a se associa com esse receptor, estabilizando-o e promovendo a retenção da cascata de sinalização a jusante. Além disso, foi possível observar que a USP2a também estabiliza formas mutantes do EGFR presentes em linhagens de tumores de pulmão e que o par USP2a-EGFR está coordenadamente superexpresso neste tipo de tumor. A estabilização do EGFR aparentemente ocorre nos endossomos precoces a partir da presença da USP2a nestas vesículas, entretanto não se sabe como USP2a é direcionada para este microdomínio da célula e quais são os parceiros moleculares da USP2a que medeiam este direcionamento. Estudos anteriores com outras deubiquitinases, USP8 e AMSH, mostram que a subunidade STAM do ESCRT-0 está envolvida em direcionar as enzimas aos endossomos, de modo que esse tráfego endocítico dependente de STAM pode acontecer com a USP2a.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Caracterizar bioquímica e funcionalmente a deubiquitinase USP2a em processo de endocitose do tipo tirosina-quinase. Esta tese teve como modelo o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), devido ao seu importante papel na progressão de diferentes tumores.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Clonar, expressar e purificar a deubiquitinase USP2a;
- Produzir anticorpos policlonais contra USP2a a partir de imunização de camundongos e coelhos;
- Produzir hibridomas secretores de anticorpos monoclonais que reconheçam a proteína de interesse a partir da fusão de esplenócitos de camundongo com células de mieloma;
- Verificar se há a interação da USP2a com o componente protéico STAM do ESCRT-0;
- Avaliar o papel de STAM na estabilização do EGFR pela via dependente de USP2a;
- Analisar a alteração fenotípica de tumores de próstata murinos ao suprimir geneticamente a expressão de FASN, um substrato da deubiquitinase USP2a.

1.3 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a enzima USP2a interage e estabiliza diferentes proteínas envolvidas com a progressão do ciclo celular, entretanto ainda não há um consenso na literatura quanto ao papel oncogênico de USP2a em diferentes tumores, com exceção do carcinoma de próstata. Nesse tipo tumoral está bem estabelecida a importância da

USP2a na tumorigênese, principalmente devido à estabilização da enzima FASN, necessária à síntese de ácidos graxos nas células de alta replicação.

A interação de USP2a com componentes do ESCRT-0 ainda não foi descrita, apesar de já se saber que ambos co-localizam com endossomos precoces. Também não está claro se a USP2a é uma proteína residente desses endossomos ou se é translocada para este compartimento durante o processo de endocitose, portanto, decidiu-se investigar uma possível interação entre essa DUB e o componente protéico do ESCRT-0, STAM, já descrito na literatura como a proteína envolvida na condução de USP8 e AMSH aos endossomos celulares.

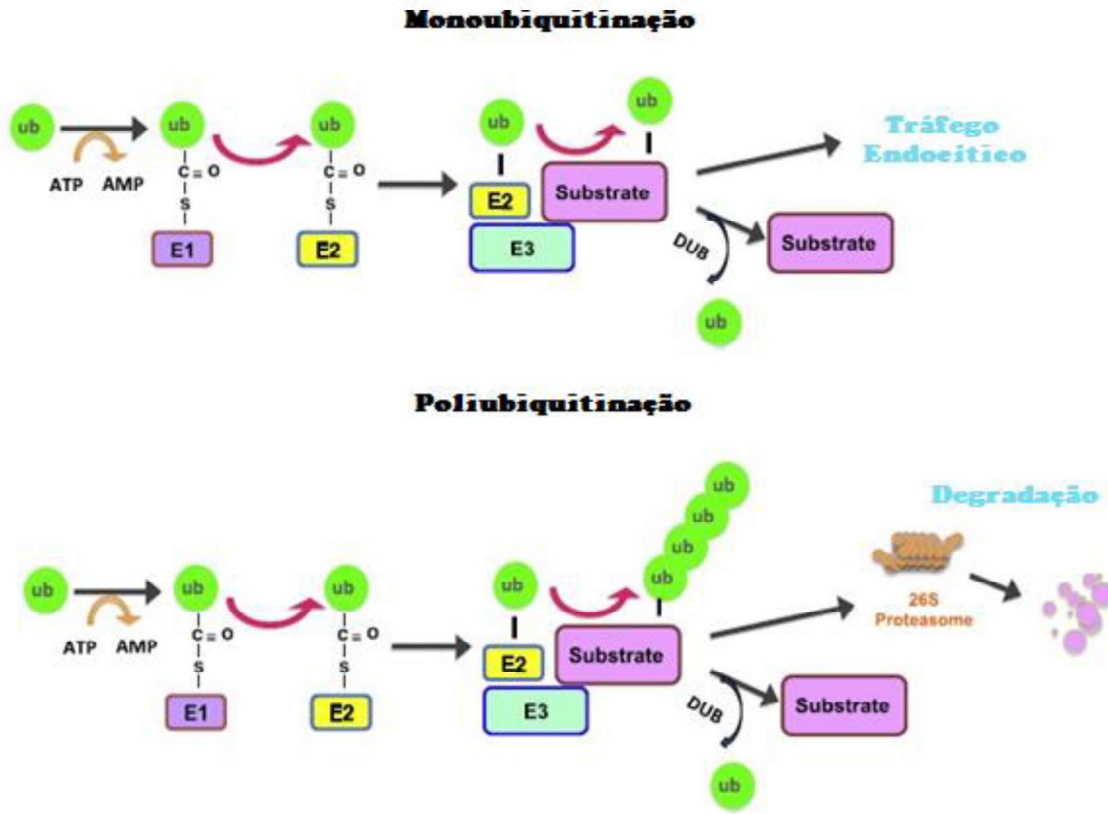
Não só a estabilização de FASN pela USP2a tem um papel importante, mas também a sua interação com o EGFR. Diversos inibidores farmacológicos do EGFR estão em fase pré-clínica ou atualmente em uso, de forma que se torna relevante o seu estudo mais aprofundado, particularmente aquele que possa levar ao desenho racional de inibidores da progressão tumoral. Dessa forma, pretendeu-se estudar o papel da USP2a na internalização e direcionamento de RTKs, particularmente o EGFR, em linhagens celulares de próstata, assim como o possível envolvimento de componentes do ESCRT-0, no caso a proteína STAM, nesse processo endocítico.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 UBIQUITINAÇÃO E TRÁFEGO DE RECEPTORES

O direcionamento de diversas proteínas pelos compartimentos intracelulares pode ser regulado pela adição de ubiquitina, um peptídeo com cerca de 76 aminoácidos, a resíduos específicos de lisina, num processo chamado ubiquitinação. Sabe-se que essa modificação é realizada em três etapas. A primeira etapa consiste na ativação da ubiquitina através da enzima E1, em que o grupo carboxílico da glicina no C-terminal da ubiquitina é ligado a um resíduo cisteína da enzima E1 através de uma ligação tioéster. A segunda etapa consiste na transferência da ubiquitina para um resíduo cisteína da enzima E2. A terceira etapa ocorre com a enzima E3 ligada a uma proteína-alvo se complexando com a ubiquitina-E2, catalisando então a transferência da ubiquitina para um grupo amina de um resíduo de lisina do substrato (LIU *et al.*, 2015). A FIGURA 1 resume esse processo, sendo que ele pode ocorrer de duas maneiras: como a monoubiquitinação ou poliubiquitinação. No primeiro, uma ubiquitina se liga a um resíduo de lisina do substrato, comumente direcionando a proteína alvo a diferentes compartimentos celulares, fazendo o tráfego endocítico. A monoubiquitinação também pode direcionar a proteína à via do corpo multivesicular e consequente degradação lisossomal. Já na poliubiquitinação várias ubiquitinas se ligam a um resíduo de lisina do substrato, comumente direcionando a proteína alvo à degradação no proteossoma (HAGLUND *et al.*, 2003).

FIGURA 1 - AS TRÊS ETAPAS DO PROCESSO DE UBIQUITINAÇÃO



Fonte: Adaptado de LIU et al., 2015.

LEGENDA: O processo de ubiquitinação pode ocorrer como a monoubiquitinação, em que uma ubiquitina se liga a um resíduo de lisina do substrato, ou como a poliubiquitinação, em que várias ubiquitinas se ligam a um resíduo de lisina do substrato. Para ambos os processos três enzimas participam da reação: E1, E2 e E3. As proteínas marcadas podem ser reconhecidas e degradadas no proteossoma ou direcionadas a diferentes compartimentos celulares.

Uma proteína altamente regulada pela via da ubiquitinação é o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR). Esse receptor tem um papel importante em vários processos fisiológicos da célula, sendo que em camundongos a deleção de seu gene costuma ser letal, e os animais que sobrevivem apresentam defeitos em pulmão, cérebro e pele (SIBILIA *et al.*, 1998). Devido à sua importância, a internalização desse receptor é bastante estudada, e sabe-se que após a ligação do EGF o receptor é rapidamente endocitado, sendo então direcionado aos endossomos precoces e tardios, podendo ser degradado via lisossomo ou reciclado de volta à superfície celular (WILEY & BURKE, 2001).

2.2 ENZIMAS DEUBIQUITINASES E A USP2a

As enzimas deubiquitinases são atualmente divididas em seis subclasses: ubiquitina hidrolase C-terminal (UCH), protease ubiquitina-específica (USP/UBPs), protease relacionada a tumores de ovário (OTU), protease com domínio Machado-Joseph (MJD), protease com domínio JAMM e a mais recentemente descrita protease ubiquitina-específica de herpes vírus (htUSPs). Dessas, todas são cisteína proteases, com exceção das proteases JAMM, uma subclasse de metaloproteases baseadas em Zinco (DAVIET & COLLAND, 2008; HANPUDE *et al.*, 2015).

A subclasse mais bem descrita de deubiquitinases é a USP, com mais de 60 membros descritos. A estrutura dessas enzimas inclui duas regiões bastante conservadas entre os membros desse grupo enzimático: uma região com cisteína e outra com histidina (Cys/His boxes), ambas com papel importante na ação enzimática das USPs. Entre essas regiões encontra-se uma sequência pouco conservada e que varia de 300 a 800 aminoácidos entre as diferentes USPs, cuja finalidade parece estar envolvida com o reconhecimento e ligação aos seus substratos (DAVIET & COLLAND, 2008; YE *et al.*, 2009).

O sítio catalítico das enzimas USPs é característico e inclui a chamada tríade catalítica, em que três resíduos de aminoácidos, histidina, cisteína e aspartato/asparagina, atuam em conjunto na remoção de ubiquitina do substrato. A função do resíduo de aspartato ou asparagina é atuar de forma a manter o resíduo de histidina na orientação correta. A histidina, por sua vez, atua sequestrando próton da cisteína que, desprotonada, realiza um ataque nucleofílico ao átomo de carbono do grupo carbonila na glicina 76 da ubiquitina, hidrolisando a ligação peptídica (DAVIET & COLLAND, 2008).

Uma deubiquitinase que vem sendo amplamente estudada devido ao seu papel em diferentes processos patológicos e fisiológicos é a USP2. Através de splicing alternativo o gene *Usp2* codifica para três isoformas da enzima: uma de 69,5 kDa denominada USP2a (ou UBP69 para outros organismos não humanos), uma de 45 kDa denominada USP2b (ou UBP45) e uma terceira isoforma de 41 kDa, denominada

USP2c (ou UBP41) (BAEK *et al.*, 1997;GOUSSEVA & BAKER, 2003;MAHUL-MELLIER *et al.*, 2012). As três enzimas apresentam diferenças entre suas regiões N-terminal, porém elas são similares quanto à porção C-terminal, o que inclui o sítio catalítico (MAHUL-MELLIER *et al.*, 2012).

Comumente enzimas da família USP apresentam localização celular citoplasmática, como é o caso da USP2a, entretanto três membros possuem domínios transmembrana: USP19, USP30 e USP48 (HANPUDE *et al.*, 2015). Sabe-se que a USP2a possui grande importância em processos intracelulares, como sua interação com a cadeia pesada de clatrina em células da linhagem de próstata LNCaP (GRANER *et al.*, 2004). Clatrina é uma proteína estrutural necessária para a internalização de RTKs e seu transporte para endossomos precoces, indicando um importante papel da USP2a no tráfego de receptores (SORKIN & VON ZASTROW, 2002;HURLEY & EMR, 2006). Além disso, observou-se que a USP2a está localizada em endossomos precoces (LIU *et al.*, 2013) o que corrobora com seu padrão puntiforme de distribuição citoplasmática previamente descrito (GOUSSEVA *et al.*, 2003, LIN *et al.*, 2000).

A distribuição tecidual da USP2a ainda não está completamente estabelecida, uma vez que anticorpos confiáveis ainda não são comercialmente disponíveis. A deleção do gene *usp2* leva a infertilidade, principalmente por problemas na mobilidade espermática (BEDARD *et al.*, 2011). Além disso, já foi observado que em tumores de próstata ocorre aumento de apoptose quando diferentes linhagens tumorais são silenciadas para a expressão de USP2a (GRANER *et al.*, 2004;PRIOLO *et al.*, 2006). Interessantemente, a expressão de USP2a em linhagens (HeLa, PC3, NSCLC) é altamente regulada, uma vez que mesmo sob condições de superexpressão, a cinética de degradação da mesma ocorre em 24 horas, não sendo mais detectada em 48 horas pós-transfecção. Além disso, formas truncadas de USP2a são detectadas em alguns tipos celulares, sugerindo um processamento proteolítico específico desta proteína. (Silvio Zanata e Massimo Loda, dados não publicados) Estes dados sugerem um mecanismo de rápido clareamento da USP2a das células que superexpressam esta enzima, entretanto não se sabe qual o mecanismo utilizado pela célula para tal fim.

2.3 USP2a E CÂNCER

A importância da USP2a para células tumorais está relacionada com seus alvos moleculares na célula, que incluem a enzima FASN (GRANER *et al.*, 2004), ciclina D1 e A1 (SHAN *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2012), Mdm2 (STEVENSON *et al.*, 2007), MdmX (ALLENDE-VEGA *et al.*, 2010), EGFR (LIU *et al.*, 2013) e Aurora A (SHI *et al.*, 2011). Recentemente observou-se uma correlação positiva de expressão entre USP2a e c-Myc em adenocarcinomas de próstata, com o envolvimento específico do microRNA-34b/c e o eixo Mdm2-p53 (BENASSI *et al.*, 2012).

Em células de carcinoma de pâncreas foi observado que a USP2a interage e estabiliza a proteína quinase Aurora A, importante em processos de mitose e meiose celular devido à sua função na progressão do ciclo celular. O silenciamento da expressão da deubiquitinase leva ao aumento da degradação de Aurora A e reduz em cerca de 62% a proliferação das células tumorais, fenótipo esse que pode ser resgatado ao se superexpressar a proteína quinase (SHI *et al.*, 2011).

A análise de gliomas humanos com diferentes graus de invasividade, com base nos critérios estabelecidos pela organização mundial de saúde, mostrou que em gliomas de alto grau, graus III e IV, o nível de expressão de USP2a é maior se comparado ao nível de expressão da enzima em tumores de baixo grau, graus I e II. Além disso, há uma relação direta entre o nível de expressão da deubiquitinase e o da enzima FASN, cuja expressão também é aumentada em tumores mais invasivos (TAO *et al.*, 2013).

Em células tumorais de colo uterino (HeLa) e linhagens de tumores de pulmão (NSCLC) foi observado que a USP2a estabiliza o receptor do tipo tirosina-quinase de EGF (EGFR) após ativação deste pelo ligante (LIU *et al.*, 2013). Além disso, os sinais positivos de ativação a jusante do EGFR, como STAT3, também são mantidos. Tal sinalização positivamente sustentada está diretamente associada ao desenvolvimento do fenótipo tumoral em células que dependam de EGF (GRANDIS *et al.*, 1998). A proteína mutante USP2a (C276A), cataliticamente inativa, possui propriedades opostas e atua como um dominante-negativo, uma vez que acelera a degradação do EGFR, quando comparada às células que expressam taxas endógenas de USP2a (LIU *et al.*, 2013). Não está claro se este dominante-negativo (USP2a-mutante) e silenciamento

de USP2a poderiam induzir efeitos biológicos semelhantes em linhagens tumorais, isto é, acelerar a degradação do EGFR concomitantemente à regulação negativa da via de sinalização do EGFR. Outras DUBs, como a USP8, também atuam protegendo o EGFR de sua regulação negativa induzida pela interação com EGF, uma vez que a isopeptidase é capaz de remover a ubiquitina do receptor ativado, impedindo sua degradação. O silenciamento de USP8 através de siRNA em células HeLa aumenta a ubiquitinação, e, por conseguinte, a degradação de EGFR, assim como já descrito para USP2a (BERLIN *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013).

Foi verificado também que, em células tumorais de bexiga, a USP2a é capaz de interagir e estabilizar as proteínas ciclina A1 e D1, que por sua vez são capazes de interagir com proteínas quinases CDKs e atuar no ciclo celular. A superexpressão de USP2a aumenta os níveis de expressão de ambas as ciclinas e reduz a sua degradação, gerando um aumento nos níveis de proliferação e migração das células tumorais (KIM *et al.*, 2012). Entretanto, o papel oncogênico da USP2a não é consenso na literatura. Sabe-se que cerca de 90% dos casos de câncer de bexiga diagnosticados nos Estados Unidos são do tipo não invasivo (NMIBC), com carcinoma urotelial moderadamente diferenciado. Após tratamento, de 20 a 30% dos pacientes apresentam recorrência da forma mais agressiva do tumor, MIBC, em que há invasão de tecidos musculares e alta taxa de metástase para linfonodos, fígado, pulmão, ossos ou intestino. Analisando-se os níveis de expressão de USP2a, através do mRNA, observou-se que há uma redução de 81,4% dessa enzima em pacientes com câncer em relação ao grupo controle. Além disso, comparando-se os níveis de expressão da deubiquitinase em casos MIBC e NMIBC, observa-se que a forma mais agressiva do tumor apresenta 36,3% menos USP2a do que a forma não invasiva do tumor (Jeong *et al.*, 2015). Outro estudo mostrando a não contribuição de USP2a no desenvolvimento tumoral foi feito com glioblastomas humanos, nele se observou uma correlação positiva entre os níveis de expressão de USP2a e Mdm4, sendo estes maiores em pacientes com bom prognóstico do que em pacientes com mau prognóstico da doença (WANG *et al.*, 2014).

O papel da USP2a na carcinogênese de próstata, porem, é muito mais claro, e dados da literatura concordam entre si que essa deubiquitinase modula positivamente

os processos tumorais das células. A expressão de USP2a em linhagens tumorais de próstata, como LNCaP, PC3 e DU-145, é maior se comparada com células normais de próstata, como a iPrEC. Além disso, RT-PCR de tecidos tumorais humanos mostra aumento nos níveis de mRNA dessa enzima em relação aos tecidos normais (GRANER *et al.*, 2004). O silenciamento da expressão de USP2a em células tumorais de próstata leva a um aumento na apoptose, aumento esse correlacionado com a redução na expressão de FASN, de Mdm2 e aumento de p21 e p53. Em camundongos do tipo *nude* a formação de tumores xenográficos é significativamente maior usando-se células que superexpressam a forma cataliticamente ativa da USP2a em relação ao seu mutante inativo, evidenciando a importância de sua atividade de ubiquitinase frente aos seus substratos no desenvolvimento tumoral (PRIOLO *et al.*, 2006).

O substrato de USP2a com papel principal na tumorigênese de próstata parece ser a enzima FASN. Sabe-se que a USP2a é capaz de interagir e estabilizar FASN, sendo que a superexpressão da forma ativa da ubiquitinase mantém os níveis de FASN maiores que o controle que não superexpressa USP2a ou a superexpressão da sua forma inativa, evidenciando a importância da remoção de ubiquitina na estabilização de FASN. Em células tumorais LNCaP observou-se que o silenciamento de USP2a com siRNA leva a um aumento na apoptose em relação ao controle, entretanto esse fenótipo é resgatado se essas células superexpressam a enzima FASN, mostrando que o silenciamento de USP2a altera o nível de apoptose celular devido à redução nos níveis de FASN (GRANER *et al.*, 2004). A FASN é uma enzima com estrutura complexa, formada por sete subunidades e múltiplos domínios catalíticos, compondo dois polipeptídeos de cerca de 272 kDa cada. Através de uma série de reações carboxilativas a partir de acetil-CoA e malonil-CoA, essa enzima é capaz de produzir palmitato, o ácido graxo mais comumente encontrado em organismos eucariotos, e necessário à formação de fosfolípidos de membrana. Por esse motivo, em células normais há uma baixa expressão dessa enzima, com exceção de tecido adiposo e fígado, por exemplo, cujos níveis de expressão são altos. Em tumores, porém, a expressão de FASN é aumentada, e quanto maior essa expressão, pior o prognóstico e maior a presença de metástases (LITTLE & KRIDEL, 2008).

2.3 COMPLEXOS PROTÉICOS ESCRTs

Quando endocitados, os receptores da superfície celular podem sofrer dois destinos: redirecionamento à membrana ou degradação. A sinalização para qualquer desses destinos é feita pela mono ou poliubiquitinação, sinais esses que posteriormente são lidos pela maquinaria dos ESCRTs (WRIGHT *et al.*, 2011). Modificações como fosforilação e ubiquitinação são importantes para controlar o tráfego de proteínas marcadas pelos compartimentos endocíticos (WRIGHT *et al.*, 2011).

Os ESCRTs podem ser divididos em seis principais complexos protéicos: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III, Vps4-Vta1e ALIX. Essas proteínas atuam em conjunto numa cadeia de eventos lineares que permite conduzir uma proteína marcada até o corpo multivesicular (MVB) (HURLEY, 2010).

O ESCRT-0 é um heterodímero composto por duas subunidades: Hrs e STAM. Esse complexo protéico é responsável por iniciar o processo de direcionamento de proteínas marcadas com ubiquitina até o MVB, ligando-se a elas e as agrupando. Entre suas funções está recrutar clatrina, ubiquitina ligases e enzimas deubiquitinases (HURLEY, 2010).

O ESCRT-I atua em conjunto com o ESCRT-II formando os chamados “bud necks”, necessários à invaginação da membrana do endossomo, de modo a gerar vesículas intraluminais que formarão o corpo multivesicular (WOLLERT & HURLEY, 2010). O ESCRT-I é um complexo grande, com cerca de 350 kDa, composto por quatro subunidades, sendo uma delas a TSG101, que possui um domínio UEV (ubiquitin E2 variant) de ligação à ubiquitina, capaz de interagir com proteínas ubiquitinadas e com a região P(S/T)XPV do ESCRT-0 (KATZMANN *et al.*, 2001; HURLEY, 2010).

O ESCRT-II é formado por três subunidades, em que uma delas é repetida duas vezes, formando um heterotetrâmero. Uma delas, a subunidade EAP45, também é capaz de se ligar à ubiquitina, através do domínio GLUE (GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45) (HURLEY, 2010).

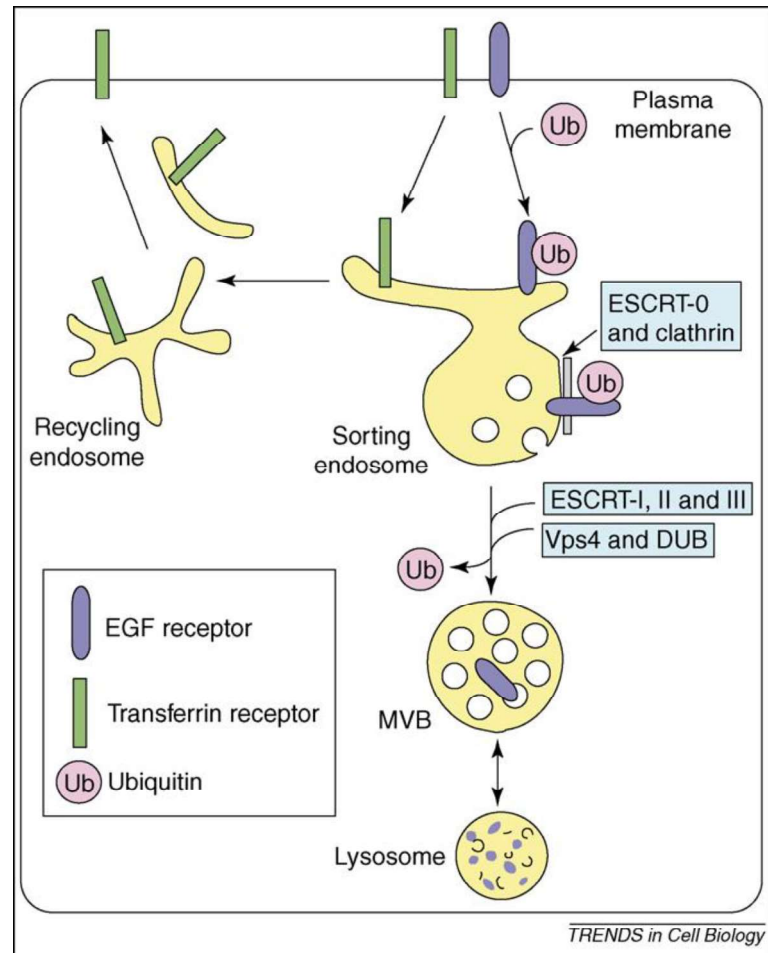
O ESCRT-III se apresenta no citoplasma da célula como monômeros inativos, polimerizando-se na forma ativa do complexo apenas na membrana. Sua função é atuar como uma maquinaria de cisão, principalmente nas invaginações de membrana

formadas pelos ESCRT-I/II. Diferentemente dos ESCRTs anteriores, o ESCRT-III não possui domínios de ligação à ubiquitina (HURLEY, 2010; WOLLERT & HURLEY, 2010)

O complexo protéico Vpsa4-Vta1 está envolvido no ciclo do ESCRT-III, pois é responsável por liberá-lo da membrana e repor o repertório das subunidades de ESCRT-III no citoplasma da célula. Já o complexo ALIX atua direcionando a maquinaria dos ESCRTs durante a divisão celular (HURLEY, 2010).

A figura 2 resume o envolvimento dos ESCRTs no tráfego de proteínas, exemplificando o receptor de EGF e de transferrina. Após a sua endocitose, o EGFR é marcado por ubiquitina, sendo então direcionado à via endocítica onde encontra o primeiro componente dos ESCRTs, o ESCRT-0, que é capaz de se ligar à ubiquitina. O ESCRT-0 recruta demais componentes dos ESCRTs que passam a atuar sobre o endossomo, reciclando o *pool* citoplasmático de ubiquitina, recrutando enzimas deubiquitinases e criando invaginações de membrana que formarão vesículas intralumenais, estabelecendo o corpo multivesicular. A fusão do MVB com o lisossomo culmina na degradação do receptor. Já o receptor de transferrina, não marcado para a degradação com ubiquitina, acaba sendo enviado de volta à membrana através de endossomos de reciclagem. Essa não é a única forma de reciclar proteínas de membrana, a presença de DUBs nos endossomos precoces permite a remoção de sinais de degradação de proteínas, atuando em processos de reciclagem de receptores da célula.

FIGURA 2 - ENVOLVIMENTO DOS ESCRTs NA ENDOCITOSE DE PROTEÍNAS



Fonte: (CLAGUE & URBE, 2006)

LEGENDA: Papel dos complexos proteicos ESCRTs na reciclagem ou degradação de receptores da membrana celular. ESCRT-0 inicia o processo, identificando e agrupando proteínas-alvo marcadas com ubiquitina. Através da atuação coordenada dos demais complexos, a formação de vesículas intralumenais no endossomo leva à formação do corpo multivesicular (MVB), culminando na degradação das proteínas-alvos no lisossomo. Alguns receptores, porém, podem ser levados de volta à membrana plasmática através dos endossomos de reciclagem.

Dados da literatura sugerem que possíveis parceiros moleculares de DUBs poderiam ser proteínas membros dos complexos ESCRT (HURLEY & EMR, 2006), particularmente ESCRT 0-I, mas não componentes mais tardios na formação dos corpos multivesiculares, tais como ESCRT II-III (LIU et al., 2013). Sabe-se que a subunidade Hrs do ESCRT-0 possui em sua estrutura um domínio “zinc finger” FYVE (Fab1, YOTB, Vac 1 e EEA1) e um domínio de ligação à ubiquitina DUIM, necessários para sua função endocítica. Enquanto a região FYVE liga-se ao fosfatidilinositol-3-

fosfato (PI3P) e é a responsável pela interação do ESCRT-0 com os endossomos precoces, enquanto a região DUIM é uma variação do domínio UIM, consistindo de uma estrutura capaz de se ligar a duas ubiquitinas ao invés de uma, pois duas sequências UIM são intercaladas formando uma hélice em que ambas as faces podem se ligar à ubiquitina (HURLEY *et al.*, 2006).

A família de proteínas STAM (Signal-transducing adaptor molecule), compreende a molécula STAM1 e STAM2, também chamada de EAST e Hbp. Essas proteínas possuem cerca de 50% de identidade em suas sequências de aminoácidos, sendo a região SH3 (do inglês Src homology 3) idêntica entre ambas. Ambas são ubiquamente expressas nos tecidos de mamíferos, em proporções semelhantes. A estrutura dessas proteínas compreende, além da região SH3, um domínio de interação a ubiquitina (UIM, do inglês ubiquitin-interacting motif), uma sequência de ativação de imuno-receptor baseada em tirosina (ITAM, do inglês Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) e uma região VHS (Vps27p-Hrs-STAM) (KANAZAWA *et al.*, 2003). Os resíduos de tirosina de STAM podem ser fosforilados frente a diferentes estímulos celulares, principalmente interleucinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-3) e fatores de crescimento (GM-CSF, PDGF, EGF), sendo, portanto, uma molécula adaptadora com importante papel em várias vias de sinalização. Sua função está diretamente relacionada com sua expressão, que é ubíqua entre vários tecidos e células do organismo (TAKESHITA *et al.*, 1996; YAMADA *et al.*, 2001). A deleção do gene STAM1 em camundongos resulta em embriões viáveis, mas com perda de neurônios piramidais CA3 do hipocampo, entretanto a deleção do gene que codifica para STAM2 não leva a uma alteração nesses neurônios, sendo esses animais normais histologicamente para diferentes tecidos, incluindo o hipocampo. Quando ambas as proteínas são deletadas os embriões tornam-se inviáveis (YAMADA *et al.*, 2001; KANAZAWA *et al.*, 2003) demonstrando que há certa redundância e sobreposição funcionais entre STAM1 e STAM2.

De fato, a importância dos componentes do ESCRT-0 no recrutamento de DUBs para os endossomos já foi estabelecida, uma vez que já foi descrito que STAM é capaz de se ligar a duas DUBs, USP8/UBPY (ubiquitin isopeptidase Y) e AMSH (adaptor molecule binding to STAM-SH3 domain) (TANAKA *et al.*, 1999; KATO *et al.*, 2000). Classicamente é sabido que regiões do tipo SH3 interagem com sequências ricas em

prolina, como PXXP, entretanto novas e diferentes sequências de aminoácidos também já foram descritas para essa interação. Sabe-se, por exemplo, que o recrutamento de AMSH para os endossomos é dependente da região RXXK, responsável pela interação com o domínio SH3 de STAM. (KATO *et al.*, 2000; BERLIN *et al.*, 2010). Portanto, parece que STAM está envolvida diretamente no transporte de enzimas deubiquitinases aos endossomos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CLONAGEM MOLECULAR DE USP2a6His

Para a expressão em *E. coli*, foi usado o vetor pET28a(+) (Novagen), com a expressão N-terminal da cauda de histidina, que em geral beneficia a solubilidade de molécula a ser expressa.

Para a clonagem da USP2a nesse vetor foi utilizada como molde a sequência codificante clonada em vetor de expressão (pDEST-USP2a) obtido por colaboradores do Dana-Farber Cancer Institute (Boston, MA, USA) (GRANER et al., 2004, PRIOLO et al., 2006). Essa clonagem foi feita empregando-se PCR (Polymerase Chain Reaction), e os iniciadores oligonucleotídicos específicos desenhados para isso foram:

P1: 5'- CAGGTTTCGCTAGCATGTCCCAGCTCT- 3'

P2: 5'-TGGTTAAGCTTTTCACATTCTGGAGGGCG-3'

O inserto foi sintetizado nas seguintes condições: 2,5 µL de tampão para Pfu DNA polimerase 10 vezes concentrado, 2 mM de MgSO₄, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 U de Pfu DNA polimerase, 0,5 µM de cada iniciador (*forward* e reverso), com todos os reagentes citados da marca Promega, 500 ng de pDEST-USP2a e água ultrapura completando 25 µL de volume reacional. A reação foi incubada a 95 °C por 2,5 minutos, seguida de 40 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95°C por 40 segundos, 67 °C por 45 segundos, 72 °C por 1,5 minutos, e, após termino dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos, todas as etapas em termociclador (BioRad MyCycler). A reação foi então analisada em gel de agarose 1% em TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8) contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) juntamente com 0,5 µg do marcador de pares de base 100 bp e Lambda *HindIII* ladder (Fermentas), com o resultado visualizado sob luz ultravioleta. O produto de PCR obtido foi purificado do gel de agarose por gel-extração usando-se kit comercial da QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit). A eluição do inserto foi feita com 40 µL de água ultrapura.

A reação de digestão do inserto e do plasmídeo foi com 5 µL de tampão “Tango” concentrado 10 vezes (Fermentas), 10 U da enzima de restrição *NheI* (Fermentas), 20 U da enzima de restrição *HindIII* (Fermentas), o inserto gel-extraído e água ultrapura completando para um volume reacional de 50 µL. A digestão foi realizada a 37 °C por 4 horas, e então a inativação da enzima a 65 °C por 20 minutos.

Para a reação de ligação, usou-se uma fração molar entre plasmídeo e inserto digeridos de 1:5. Como foram usados 50 ng de pET28a(+) digerido, o que equivale a 0,014 pmol de produto, foi necessário 0,070 pmol de inserto digerido. Portanto, a reação foi feita usando-se 1 µL de tampão para T4 DNA ligase (Fermentas) concentrado 10 vezes, 5 U de T4 DNA ligase recombinante (Fermentas), 50 ng (0,014 pmol) de pET28a(+) digerido, 84 ng (0,070 pmol) de inserto digerido, e água ultrapura completando para um volume reacional de 10 µL. A reação de ligação foi realizada a 16 °C por 16 horas, seguida por inativação da enzima a 65 °C por 15 minutos. Após a reação de ligação foi feita a eletroporação dos plasmídeos em bactérias *E. coli* da estirpe DH5α. A suspensão de bactérias eletrocompetentes foi adicionada do produto de ligação, incubadas no gelo durante 1 minuto e submetidas a uma diferença de potencial de 1.40 kV para a introdução do DNA na célula (eletroporador Bio-Rad). Após os pulsos elétricos, foi adicionado às células 1 mL de meio LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L) para recuperação celular durante uma hora a 37°C sob agitação leve (SAMBROOK et al , 2001) Após a recuperação das células, a cultura foi plaqueada em meio sólido LB-ágar 15 g/L contendo 30 µg/mL de canamicina (SAMBROOK et al , 2001) .

As colônias que conseguiram crescer em meio seletivo foram usadas para reação de PCR de colônia. Essa reação foi feita coletando-se colônias de bactérias em palitos que foram então passados no fundo de microtubos próprios para reações de PCR. Cada amostra recebeu 1 µL de tampão para Taq DNA Polimerase 10 vezes concentrado, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 0,5 µM de iniciador forward P1, 0,5 µM de iniciador reverse P2, 1 U/µL Taq DNA polimerase, e água ultrapura autoclavada completando para volume reacional de 10 µL. Os iniciadores usados e as condições da reação foram os mesmos usados na produção do inserto, exceto o primeiro aquecimento a 95 °C que durou 5 minutos, com o objetivo de garantir uma lise eficiente

das bactérias presentes no tubo para liberação do material genético no meio reacional. A reação foi analisada em gel de agarose 1%.

As colônias que apresentaram resultado positivo na PCR de colônia foram usadas para se fazer uma preparação plasmidial em pequena escala. Os clones recombinantes foram cultivados em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico canamicina a 30 µg/mL durante 16 horas sob agitação constante a 37 °C. Esta cultura foi então centrifugada a 5400xg por 10 minutos a 4 °C e os plasmídeos recombinantes purificados com o sistema de mini preparação de plasmídeo QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do plasmídeo obtido foi feita por análise de absorbância em 260 nm, verificando-se também a absorbância em 230 nm e 280 nm, que estão relacionadas com contaminação do plasmídeo por solventes orgânicos e proteínas, respectivamente. Essa análise foi realizada em equipamento específico, o nanodrop (Thermo Scientific). A fim de se verificar o produto clonado no plasmídeo, foi feita uma reação de sequenciamento de nucleotídeos. As reações de sequenciamento foram feitas com 1 µL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 1,5 µL de tampão para sequenciamento 5 vezes concentrado, 5 pmol de iniciador T7 promoter e 5 pmol de T7 terminator, 300 ng do plasmídeo a ser sequenciado, em um volume final de 10 µL. A reação foi realizada a 96 °C por 2 minutos e 40 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 51 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos. Após a reação, as amostras foram precipitadas, adicionando-se 1 µL de solução de precipitação (Acetato de Sódio 1,5 M, EDTA 0,25 M) e 30 µL de etanol 100% (Merck), com incubação em gelo por 10 minutos e centrifugação por 20 minutos a 20.000xg e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento recebeu 15 µL de etanol 70% (Merck) gelado para lavagem e remoção de resíduos de sais. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados e o precipitado seco em estufa a 37 °C por uma hora. As reações foram mantidas em -20 °C até serem aplicadas no sequenciador, cuja aplicação requer adição de 10 µL de formamida (HIDI) logo antes da corrida.

3.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE USP2a6His

Para a expressão em pequena escala, o plasmídeo obtido na clonagem de USP2a foi eletroporado em *E. coli* BL21 (DE3) STAR. As colônias selecionadas em meio LB-ágar com 30 µg/mL de canamicina foram inoculadas em 2 mL desse mesmo meio líquido e cultivadas durante 16 horas a 37°C e em agitação constante de 220 rpm. Esta cultura saturada foi diluída na proporção 1:100 em 10 mL de meio LB com 30 µg/mL canamicina e crescida a 37 °C sob agitação constante. Ao atingir a absorbância de 0,7 a 600 nm, cerca de 3,5 horas de crescimento, a cultura foi dividida em duas partes: uma das duas subculturas foi adicionada de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) na concentração final variando de 0,1mM a 1 mM para a indução da expressão da proteína recombinante, e a outra subcultura não recebeu o indutor de expressão. Ambas as culturas, induzida e não induzida com o IPTG, foram incubadas a 37 °C e 220 rpm por 3 horas.

Alíquotas de 1ml de cada subcultura, a induzida e seu controle não induzido, foram coletadas e centrifugadas a 4000 xg por 5 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 30 µl de tampão de amostra redutor (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol e 0.01% azul de bromofenol) para o mais alto valor de absorbância a 600nm e corrigido de acordo com a densidade óptica da cultura para as demais amostras, seguido de aquecimento a 95°C por 5 minutos. Após esse tratamento, 7 µl da amostra foram submetidos à separação eletroforética por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 10%. Após a eletroforese, o gel foi corado com azul de Coomassie para verificação das colônias de alta expressão.

Estabelecidas as condições e o clone com melhores taxa de expressão da proteína recombinante, fez-se uma nova expressão em larga escala. Esse protocolo foi semelhante ao descrito anteriormente, com a diferença centrada apenas no volume de pré-inóculo e inóculo utilizados, que se alteraram para 10 mL e 1000 mL, respectivamente. Além disso, a concentração de IPTG usada foi de 0,2 mM. Após a indução das células, elas foram coletadas por centrifugação a 5000 xg por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e a cultura sedimentada ressuspenso em

100 mL de tampão de lise nativa (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 7,0) adicionado de inibidores de protease NEM e PMSF a 1 mM, para então a proteína ser purificada.

A suspensão de células passou por lise mecânica em prensa de French, sob pressão de 1000 Pa, capaz de gerar uma força cisalhante que permite a ruptura das células bacterianas. O lisado foi centrifugado por 30 minutos a 9000xg e 4°C, e o sobrenadante e o sedimento analisados em gel de poliacrilamida 10% em tampão de amostra redutor (com 5% de β-mercaptoetanol) para verificar em qual dessas porções há mais proteína. Como a USP2a6His foi expressa em corpos de inclusão, foi necessário solubilizá-los para então seguir com a purificação. Para essa etapa, um sedimento de lisado bacteriano, referente a 200 mL de cultura bacteriana induzida com IPTG foi ressuspensionado em 20 mL de tampão de lise desnaturante (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 8 M uréia, pH 8,8) e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos sob agitação. A suspensão foi então centrifugada a 9000 xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante e o sedimento foram analisados em gel de poliacrilamida 10% em tampão de amostra redutor (com 5% de β-mercaptoetanol) para verificar se houve a solubilização da proteína.

Solubilizada a proteína, a suspensão foi incubada com 500 µL de resina de níquel (Ni-NTA Agarose QIAGEN) por 1 hora a 4° C com 10 mM de imidazol. A resina foi então lavada com 30 mL de tampão de lise desnaturante acrescido de 20 mM de imidazol. A eluição foi feita com 10 mL de tampão de lise desnaturante adicionado de 300 mM de imidazol, com coletas de amostras de 1 mL cada. Os eluatos obtidos foram analisados em gel de poliacrilamida 10% em tampão de amostra redutor (com 5% de β-mercaptoetanol), e os produtos purificados foram dialisados contra tampão PBS e quantificados pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As proteínas purificadas foram alíquotas e estocadas a -20 °C.

3.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS E MONOCLONAIS REATIVOS

A USP2a

Para produzir os anticorpos policlonais, foi necessária a imunização de camundongos com a proteína de interesse. Para isso, o projeto foi submetido ao CEEA-

SCB-UFPR para aprovação dos procedimentos que envolvam animais de experimentação, sob o certificado n° 615. Além disso, foi feita também a imunização de coelhos, entretanto uma empresa especializada na imunização e purificação de soros hiperimune foi contratada (Célula B, Rio Grande do Sul).

Os camundongos receberam por imunização, via intraperitoneal, 20 µg de USP2a6His purificada, 90 µL de adjuvante de Freund (Sigma) completo na primeira imunização e incompleto nas demais, 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e PBS completando o volume da dose para 180 µL. Cada imunização teve um intervalo de 14 dias, e após 14 dias da última imunização, os soros hiperimunes foram coletados através da veia periorbital para verificação da resposta imune, feita por ensaios de *western blotting* e por ensaio imunoenzimático ELISA.

Para obtenção do soro hiperimune, o sangue retirado foi deixado a 37 °C por 1 hora e então centrifugado por 7 minutos a 3000 xg, o sobrenadante foi aliquoteado e mantido a 4°C. A primeira análise feita foi o ensaio imunoenzimático ELISA, imobilizando-se 1 µg de USP2a6His em 50 µl de tampão carbonato (100 mM, pH 9,6) por poço de 0,3 cm², seguida de bloqueio dos sítios não ocupados pelo antígeno, com 300 µl/poço de solução de bloqueio (PBS, 1% de albumina bovina) por uma hora a 37 °C. Os soros dos animais imunizados, diluídos de 1:100 a 1:12800 em PBS com 0,1% de BSA foram incubados por duas horas a 37 °C. Os poços foram então lavados em três ciclos com PBS acrescido de 0,05% de tween 20 (PBST 0,05%), e foram então adicionados de 100 µL de anticorpo secundário contra imunoglobulina de camundongo conjugado com HRP (Sigma) diluído 1:5000 em solução de PBS com 1% de albumina bovina. Após incubação de uma hora a 37 °C fez-se outros três ciclos de lavagens e a reação foi revelada adicionando-se 100 µl/poço de solução de revelação TMB (Thermo). Após incubação em câmara escura por 30 minutos, a reação foi bloqueada através da adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico 1 M. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de placas com filtro para comprimento de onda de 450 nm (BioRad).

Os soros também foram testados por *western blotting*. As amostras foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose Hybond-C Extra Amersham Biosciences (GE Healthcare) durante 1 hora sob diferença de potencial constante de

100 V em tampão de transferência gelado (190 mM glicina, 25 mM Tris, 20% metanol). A membrana foi bloqueada durante 1 hora com TBST (150 mM NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). A membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio por 16 horas à 4 °C sob agitação. Após a incubação, a membrana foi lavada cinco vezes por três minutos com TBST e em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário, anti-imunoglobulina de camundongo ou coelho, conjugado a HRP peroxidase HRP (Sigma) na diluição de 1:5000, durante uma hora à temperatura ambiente. Um novo ciclo de lavagem foi realizado. Então, a membrana foi incubada com o substrato adequado para a reação quimioluminescente empregando-se o Kit West Pico (Pierce Co.). Filmes de auto-radiograma Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) foram expostos à membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse. Esse protocolo foi seguido para todos os ensaios de *western blotting*, e a tabela 1 resume todos os anticorpos usados, com suas respectivas diluições de uso.

TABELA 1 – ANTICORPOS E DILUIÇÕES UTILIZADOS

Anticorpo	Diluição	Marca	#Catálogo
anti-HA	1:1000	BioLegends	901501
anti-Actina	1:10000	Sigma	A5316
anti-USP2a	1:1000	Produzido pelo Autor	
anti-STAM	1:1000	CST	13053
anti-EGFR	1:500	Santa Cruz	367974
anti-Flag	1:1000	Sigma	F3165
anti-FASN	1:1000	CST	3180
anti-Rab11	1:250	Invitrogen	715500
anti-Rab7	1:1000	CST	93678
anti-Tfr	1:1000	Abcam	ab25630
anti-GFP	1:500	CST	2956
anti-Ubiquitina	1:1000	Calbiochem	

A obtenção dos hibridomas tem início na fusão dos esplenócitos do animal imunizado com células de mieloma. Para as fusões, foram utilizadas células mielóides da linhagem P3X63Ag8.653 (ATCC nº CRL-1580™). Antes da fusão, as células mielóides foram mantidas em meio de manutenção (RPMI, 2 mM de glutamina, 20% de soro fetal bovino, 10 µg/mL estreptomicina, 10 U/mL de penicilina e 2,5 µg/mL anfotericina B). Três dias antes da fusão os animais escolhidos foram imunizados via intravenosa com 20 µg da proteína recombinante purificada em 60 µl de PBS. No dia programado, o animal hiperimune foi anestesiado com uma dose única contendo 20 mg/kg de cloridrato de xilazina (Kensol), 100 mg/kg de cloridrato de cetamina (Quetamina) e 3 mg/kg de maleato de acepromazina (Aceproven) e o sangue total foi coletado por punção cardíaca (eutanásia por exosanguinação e posterior uso do soro como repertório de anticorpos policlonais).

Em seguida, o baço foi retirado assepticamente em fluxo laminar, sendo então macerado em meio de manutenção sem soro fetal bovino, para liberação dos esplenócitos. Com o auxílio de uma micropipeta, as células foram dissociadas, e filtradas em seringa contendo um elemento filtrante constituído por uma malha de nylon estéril. A suspensão obtida foi centrifugada por 10 minutos a 500 xg e então adicionada de 5 mL de cloreto de amônio gelado (150 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 0,1 mM EDTA) por 5 minutos em banho de gelo para que ocorresse a lise seletiva de hemácias. Adicionou-se meio de manutenção sem soro para completar 25 mL e a suspensão foi centrifugada novamente por 10 minutos a 500 xg. Novamente o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se mais 25 mL de meio de manutenção sem soro.

As células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado, com o sedimento celular ressuspenso em mais 20 mL de meio sem soro e sua quantificação celular feita por contagem em câmara de Neubauer. As células de mieloma foram misturadas aos esplenócitos na proporção de 1:5 e novamente a mistura celular foi centrifugada por 10 minutos a 500 xg. O sobrenadante foi descartado e, durante 1 minuto, 1 mL de PEG 50% (Roche) aquecido a 37 °C foi gotejado à mistura em constante agitação branda. Adicionou-se então 1 mL de meio de manutenção sem soro gotejando-o durante 2 minutos (com agitação branda), sendo essa etapa realizada duas vezes. Por fim, adicionaram-se 7 mL de meio de manutenção sem soro gotejando-os

durante 2 minutos (com agitação branda) e a mistura centrifugada foi por 5 minutos a 1500 rpm. As células foram ressuspensas em volume suficiente de meio de manutenção e distribuídas em placas de 96 poços, a 100 µL/poço na razão de aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células por poço.

As células sintetizam nucleotídeos através de duas vias: a via de salvamento e a via de novo. A linhagem de mieloma utilizada é deficiente para HPRT, uma enzima necessária à produção de nucleotídeos pela via de salvamento, de modo que essas células só possuem a via de novo para síntese de nucleotídeos. Porém, o meio de cultivo HAT possui aminopterina em sua composição, uma droga que bloqueia a via de novo da síntese de nucleotídeos, levando as células de mieloma à morte. Todavia se essas células se fusionarem com os esplenócitos, que possuem a expressão de HPRT e, portanto, têm a via de salvamento funcional, elas serão capazes de sobreviver no meio HAT. Em linhas gerais, células deficientes em HPRT (mielomas não fusionados) serão levados à morte, os esplenócitos que não se fundiram são naturalmente inviáveis em cultivo e morrem em cerca de uma semana, portanto, os hibridomas, formados pela fusão entre a célula de mieloma e os esplenócitos, serão as únicas células capazes de sintetizar nucleotídeos pela via de salvamento (da qual a hipoxantina e a timidina são intermediários) e são, portanto, as únicas células que sobrevivem ao período de seleção. Tendo isso em mente, no dia seguinte à fusão 100 µl de meio HAT (meio de manutenção, 0,1 mM hipoxantina de sódio, 0,4 µM aminopterina, 0,8 mM timidina) foram adicionados a cada poço. Durante a semana seguinte as células tiveram o seu meio parcialmente trocado duas vezes por meio HAT, essas duas trocas devem fazer com que a concentração de meio HAT fique em torno de 87,5%, suficiente para a ação da aminopterina. No total, são três adições de meio HAT com uma periodicidade de duas vezes por semana. Em seguida foram feitas três trocas parciais de meio com meio HT (meio de manutenção, 0,1 mM hipoxantina de sódio, 0,8 mM timidina) mantendo-se a periodicidade. Esse procedimento mantém elevados os níveis dos intermediários da via de salvamento e dilui a aminopterina até aproximadamente 11%. Dessa forma, os hibridomas foram mantidos pelos intermediários até que as diluições sucessivas em meio RPMI fossem suficientes para que a concentração da aminopterina não afetasse mais as células. Após a seleção, as células foram mantidas em meio de manutenção

com a mesma periodicidade de troca, cerca de 72 horas, até o fim do período de varredura dos hibridomas.

A presença ou ausência de anticorpos produzidos contra antígeno recombinante tanto nos soros hiperimunes quanto nos sobrenadantes de cultura foi avaliada através de ensaio imunoenzimático ELISA, conforme descrito anteriormente. Após a varredura dos hibridomas, as células positivas para a secreção de anticorpo contra USP2a passaram por um processo chamado de diluição limitante. Essa etapa tem por objetivo isolar apenas uma célula secretora de anticorpo, garantindo a produção de um anticorpo monoclonal. Para essa diluição limitante, foi utilizada uma placa de 96 poços para cada clone secretor de anticorpos. Na primeira linha da placa (linha A) foram plaqueadas 200 células do hibridoma em 200 μ L de meio de cultivo, e as linhas restantes (linhas B a H) receberam apenas 100 μ L do meio de cultivo. Da linha A foram removidos 100 μ L, que foram então solubilizados na linha B, bastante homogeneizados, e novamente 100 μ L foram removidos da linha B e passados para a linha C. Esse processo foi repetido até a linha H, onde os últimos 100 μ L foram removidos e descartados. Desse modo, criou-se na placa de cultivo uma quantidade decrescente de células, indo de 100 células/poço até 0,8 célula/poço. Após a diluição limitante, as células foram observadas em microscópio óptico invertido para se garantir o isolamento adequado de uma célula. Feita a diluição, os clones foram varridos por ELISA, e os clones positivos sofreram nova diluição limitante, para haver total certeza de que apenas uma célula originou a colônia produtora de anticorpo.

3.4 ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS DE PRÓSTATA COM sUPEREXPRESSÃO DE USP2aHA

Para estabelecer linhagens que superexpressem USP2a de modo permanente, as células-alvo LNCaP e RWPE-1 foram infectadas por retrovírus com o gene de interesse clonado em vetor pBABE. Esse vetor possui sítio de resistência ao antibiótico puromicina e tag de HA (sequência de aminoácidos YPYDVDPYA), e é usado transfectando-se, inicialmente, uma linhagem de células 293T onde os vírus serão

formados, para então haver a infecção das células de interesse. Neste trabalho foram usados três construtos clonados no vetor pBABE:

- pBABE-EV: o vetor vazio;
- pBABE-USP2aWT: vetor com a sequência que codifica para a forma selvagem da enzima USP2a;
- pBABE-USP2aMUT: vetor com a sequência que codifica para a forma cataliticamente inativa da enzima USP2a.

Células 293T foram plaqueadas a 5×10^5 células por P60, e então transfectadas, após 32h do plaqueamento, com 6 μ L de Eugene 6 (Roche), 2 μ g do plasmídeo com o gene de interesse (no caso o pBABE), 1 μ g do vetor de empacotamento retroviral pcL e meio Opti-MEM sem soro fetal bovino completando para um volume reacional de 100 μ L. O meio de transfecção foi então adicionado às células, já em meio DMEM com 10% de SFB e sem antibiótico. Após 24h da transfecção, as células 293T receberam o meio de cultivo usado para a célula alvo, RPMI com 10% SFB para LNCaP e DMEM com 10% SFB, piruvato e aminoácidos não essenciais para RWPE-1. Passadas 24h, o meio das células 293T, nesse momento já com partículas retrovirais, foi coletado e filtrado em membrana de 0,45 μ m, adicionado de 5 μ g/mL de polybrene (Sigma), e então adicionado às células RWPE-1 ou LNCaP plaqueadas a 6×10^5 células/P60 com 24h ou 48h de antecedência, respectivamente. As células foram deixadas 7 horas a 37 °C com o meio de infecção, e então lavadas com PBS e adicionadas de meio de cultivo fresco. O processo de infecção foi repetido após 24h da primeira adição de meio com partículas retrovirais, e após 24h da segunda infecção as células começaram a ser selecionadas com 2 μ g/mL de puomicina. Durante essa etapa uma célula controle, não infectada com as partículas retrovirais, também recebe meio de seleção, e, se observada morte celular em até 48h, a concentração de puomicina é ajustada para 1 μ g/mL.

Essa etapa foi realizada em triplicata para cada um dos construtos, e a seleção das células foi feita com base no nível de superexpressão da USP2a, observado por *western blotting*, conforme protocolo descrito anteriormente. As células foram lisadas

com tampão RIPA (25mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% Deoxicolato de sódio, 0,1% SDS) acrescido de PMSF, fenantrolina e NEM na concentração final de 1 mM, além de coquetel comercial de inibidores de proteases (Thermo). A lise foi conduzida por 20 minutos em banho de gelo, e as amostras foram então centrifugadas a 16000 xg durante 15 minutos a 4° C. Os extratos celulares tiveram sua concentração protéica determinada pelo método de Bradford, e cerca de 20 µg/poço de lisado celular foram aplicados em gel de poliacrilamida 10%.

3.5 CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO DE STAM E SEUS MUTANTES

Optou-se pelo uso do vetor pEGFP (Clontech) para a clonagem de STAM. A sequência de RNA mensageiro (mRNA) usada para o desenho dos iniciadores foi a do gene para a molécula STAM1 humana (NM_003473.3) do banco de dados do NCBI. Para fins de simplificação, a designação STAM será usada para se referir a STAM1, e quando necessária a distinção entre STAM1 e STAM2 as isoformas serão devidamente especificadas.

Para a clonagem da sequência total do gene (pEGFP-STAMWT) foram desenhados dois iniciadores, empregando-se os mesmos princípios descritos anteriormente:

F1: 5'-CACGGAGCTCAGATGCCTCTTTTGTG – 3'
R1: 5'- AACACGAATTCCTATAGCAGAGCCTTCT – 3'

A clonagem da sequência foi precedida pela obtenção de cDNA referente ao mRNA no qual se baseou a estratégia de clonagem. Para isso, foi realizada uma reação de transcriptase reversa a partir de RNA extraído de células Hela. Essa linhagem foi escolhida por ser a linhagem disponível no laboratório com maior nível de expressão de STAM, uma vez que ainda não tínhamos disponíveis no laboratório as linhagens de próstata. O RNA total foi extraído usando-se o método do TRIzol (Invitrogen) seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante. Obtido o RNA, empregou-se a reação de transcriptase reversa, que foi realizada em duas etapas. Na primeira, são misturados 20

pmol de iniciadores oligodT, 500 ng de RNA total e água ultrapura completando para 5 µL de volume reacional. Para ideal funcionamento da enzima responsável pela transcrição reversa do mRNA, foi feito aquecimento em termociclador (Bio-Rad MyCycler) a 70 °C por 5 minutos e então um rápido resfriamento para 4 °C, numa tentativa de eliminar estruturas secundárias. Na segunda etapa, foram adicionados 20 µL de uma solução contendo tampão ótimo para a atividade da enzima (50mM Tris-HCl, 75mM KCl, 10mM DTT, pH 8,3 a 25 °C), 3,75 mM de MgCl₂, 0,625 mM de dNTPs, 1,25 U de RNase Out, 1 µL de transcriptase reversa *Improm II* Reverse transcriptase e água, sendo todos os reagentes da marca Promega. A reação foi conduzida a 25 °C por 5 minutos para anelamento dos iniciadores, aquecimento a 42 °C por 60 minutos para extensão das fitas de cDNA e 72 °C por 15 minutos para inativação da enzima.

O inserto foi sintetizado nas mesmas condições descritas anteriormente, mas usando-se 500 ng de cDNA como template. A reação foi incubada a 95 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95°C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 2 minutos, e, após termino dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos. A reação foi então analisada em gel de agarose 1% em TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8) contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) juntamente com 0,5 µg do marcador de pares de base 100 bp e Lambda *HindIII* ladder (Fermentas), com o resultado visualizado sob luz ultravioleta. O produto de PCR obtido foi purificado do gel de agarose por gel-extração, e digerido em tampão “Tango” (Fermentas) com 8 U da enzima de restrição *SacI* (Fermentas), 2 U da enzima de restrição *EcoRI* (Fermentas), em um volume reacional de 50 µL. A digestão foi realizada a 37 °C por 16 horas, e então inativada a 65 °C por 20 minutos. O produto digerido foi ligado ao plasmídeo com T4 DNA ligase recombinante (Fermentas), conforme descrito anteriormente, usando-se uma fração molar entre plasmídeo e inserto de 1:5 (50 ng de pEGFP e 98 ng de inserto). Após a reação de ligação foi feita a eletroporação dos plasmídeos em bactérias DH5α, e seleção em meio contendo 30 µg/mL de canamicina. As colônias que conseguiram crescer em meio seletivo foram usadas para reação de PCR de colônia, e as positivas foram usadas para se fazer uma preparação plasmidial em pequena escala. Quatro plasmídeos foram escolhidos aleatoriamente para sequenciamento de nucleotídeos, utilizando-se os iniciadores comerciais EGFP-N e

EBV. Os plasmídeos com a sequência clonada corretamente foram utilizados para expressão da proteína em células de mamífero.

Para a clonagem da sequência SH3 do gene (pEGFP-SH3) foram desenhados dois iniciadores, empregando-se os mesmo princípios descritos anteriormente:

F2: 5'- CAACATGAAGGCCTCACTGCTGAA – 3'

R2: 5'- TTCAGCAGTGAGGCCTTCATGTTG – 3'

Para este inserto, a síntese foi feita nas seguintes condições: 95 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95°C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 15 segundos, e, após termino dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos. A reação foi então analisada em gel de agarose 2% em TAE contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). O produto de PCR obtido foi purificado do gel de agarose por gel-extração, e digerido em tampão “Tango” (Fermentas) com 8 U da enzima de restrição *SacI* (Fermentas) e 2 U da enzima de restrição *EcoRI* (Fermentas) em um volume reacional de 50 µL. A digestão foi realizada a 37 °C por 16 horas, e então inativada a 65 °C por 20 minutos. O produto digerido foi ligado ao plasmídeo com T4 DNA ligase recombinante (Fermentas), conforme descrito anteriormente, usando-se uma fração molar entre plasmídeo e inserto de 1:5 (50 ng de pEGFP e 12 ng de inserto). Após a reação de ligação foi feita a eletroporação dos plasmídeos em bactérias DH5α, seleção em meio contendo 30 µg/mL de canamicina, PCR de colônia, e sequenciamento de nucleotídeos utilizando-se os iniciadores comerciais EGFP-N e EBV. Os plasmídeos com a sequência clonada corretamente foram utilizados para expressão da proteína em células de mamífero.

Para a clonagem da sequência de STAM com a região SH3 deletada (pEGFP-STAMΔSH3) foram desenhados dois iniciadores, empregando-se os mesmo princípios descritos anteriormente:

F3: 5'- ACCAAAGAGCTCGCCGAAAAGTTC – 3'

R3: 5'- GTTCGAATTCCTAATCTGCAGTCACAAAATTAGA – 3'

Para este inserto, a síntese foi feita em três etapas: a primeira foi com os iniciadores F1 e R3, incubada a 95 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95°C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto, e, após termino dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos, gerando o chamado inserto STAM Δ SH3-1. A segunda etapa foi feita com os iniciadores F3 e R1, e incubada a 95 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de incubação nas seguintes temperaturas e tempos: 95°C por 30 segundos, 61,3 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto, e, após termino dos 40 ciclos, 72 °C por 10 minutos, gerando o chamado inserto STAM Δ SH3-2. A terceira etapa foi feita sem cDNA, utilizando-se os insertos STAM Δ SH3-1 e STAM Δ SH3-2 com os iniciadores F1 e R1, e incubada em dois ciclos: um primeiro sem adição dos iniciadores, a 95 °C por 5 minutos, 63 °C por 2 minutos e 72 °C por 10 minutos, e um segundo ciclo, após adição dos iniciadores, a 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos e 72 °C por 2 minutos, repetido 40 vezes. A reação foi então analisada em gel de agarose 1% em TAE contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). O produto de PCR obtido foi purificado do gel de agarose por gel-extração, e digerido em tampão “Tango” (Fermentas) com 8 U da enzima de restrição *SacI* (Fermentas) e 2 U da enzima de restrição *EcoRI* (Fermentas) em um volume reacional de 50 µL. A digestão foi realizada a 37 °C por 16 horas, e então inativada a 65 °C por 20 minutos. O produto digerido foi ligado ao plasmídeo com T4 DNA ligase recombinante (Fermentas), conforme descrito anteriormente, usando-se uma fração molar entre plasmídeo e inserto de 1:5 (50 ng de pEGFP e 88 ng de inserto). Após a reação de ligação foi feita a eletroporação dos plasmídeos em bactérias DH5 α , seleção em meio contendo 30 µg/mL de canamicina, PCR de colônia, e sequenciamento de nucleotídeos utilizando-se os iniciadores comerciais EGFP-N e EBV. Os plasmídeos com a sequência clonada corretamente foram utilizados para expressão da proteína em células de mamífero.

Para a expressão, células foram plaqueadas a 5×10^5 células por P60, e então transfectadas, após 24h do plaqueamento, com 0,5 µg do plasmídeo, 1 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen), em 500 µL de meio Opti-MEM. O meio de transfecção foi então adicionado às células, já em meio de cultivo sugerido pela ATCC conforme a linhagem. O nível de expressão de cada peptídeo foi observado por *western blotting*,

conforme protocolo descrito anteriormente. Após 48h de transfecção as células foram lisadas com tampão RIPA acrescido de PMSF, fenantrolina e NEM a 1 mM, além de coquetel comercial de inibidores de proteases (Thermo), por 20 minutos em banho de gelo, seguida de centrifugação a 16000 xg durante 15 minutos a 4° C. Os extratos celulares tiveram sua concentração proteica determinada pelo método de Bradford, e cerca de 20 µg/poço de lisado celular foram aplicados em gel de poliacrilamida 10%.

3.6 SILENCIAMENTO DE STAM EM LINHAGENS CELULARES DE PRÓSTATA

O silenciamento de STAM foi feito conforme descrito anteriormente para a superexpressão permanente de USP2a, com a diferença de que ao invés de se usar o vetor pBABE com a sequência do gene clonada, utilizou-se o vetor pRS (Origene) com uma sequência de shRNA específica à sequência do gene de STAM1. Novamente foram utilizadas as células alvo LNCaP e RWPE-1.

Quatro sequências foram testadas para o silenciamento, são elas:

- pRS-STAM1-A: AACTGCCGATGTCACTCTGTACCAGAATG
- pRS-STAM1-B: AAGCACATCCAGTCTCTTAACCAACCACC
- pRS-STAM1-C: GCTGCTTCATCTTGAAGCAATGTGTCACC
- pRS-STAM1-D: ATGACAGTGATCCTAACTGGTGGAAAGGT

Além destas, um controle *Scramble*, com uma sequência não específica ao gene STAM1, também foi usada. Assim como descrito anteriormente, os níveis de expressão de STAM1 foram detectados por *western blotting*, conforme protocolo descrito anteriormente. As células foram lisadas com tampão RIPA acrescido de PMSF, fenantrolina e NEM na concentração final de 1 mM, além de coquetel comercial de inibidores de proteases (Thermo). A lise foi conduzida por 20 minutos em banho de gelo, e as amostras foram então centrifugadas a 16000 xg durante 15 minutos a 4° C. Os extratos celulares tiveram sua concentração proteica determinada pelo método de Bradford, e cerca de 20 µg/poço de lisado celular foram aplicados em gel de poliacrilamida 12%.

3.7 IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS MOLECULARES DE USP2a

A primeira tentativa de se identificar um parceiro molecular de USP2a foi através de ensaio de *pull-down*. Para isso, imobilizou-se cerca de 1 μ g de USP2a6His em 20 μ L de resina NI-NTA-agarose (QIAGEN) por 2 horas a 4°C. Após a incubação, a resina foi lavada 3 vezes de 5 minutos com PBS, e incubada com extrato clareado de células HeLa por 2 horas a 4°C. Após a incubação, a resina foi lavada 3 vezes de 5 minutos com PBS, adicionada de 40 μ L de tampão de amostra redutor, fervida por 5 minutos e o sobrenadante aplicado em gel de poliacrilamida 10%. O gel foi então submetido a coloração com azul de coomassie. O protocolo foi sendo modificado conforme os resultados, incluindo lavagens das resinas com tampão de lise, incubações extrato-resina na presença de 5mM de imidazol e lavagens com 10mM de imidazol em tampão de lise, todas visando aumentar a exigência do protocolo.

Outra alteração feita para minimizar o número de ligantes no *pull-down*, foi o isolamento de endossomos precoces por gradiente de densidade. Primeiramente as células foram incubadas em gelo por 20 minutos com tampão HBA (3 mM de imidazol, 1 mM EDTA, pH 7,4). A suspensão foi adicionada do mesmo volume de tampão HBB (500 mM sacarose, 3 mM de imidazol, 1 mM EDTA, pH 7,4) e incubada em gelo por mais 30 minutos, com passagens regulares em ponteira P1000 para lise celular. O lisado foi centrifugado a 2000 xg por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante adicionado de solução de sacarose 62% de modo a gerar uma solução final com 40,6% de sacarose. Essa suspensão foi colocada no fundo de um tubo cônico, e 7 outras camadas de soluções de sacarose foram gentilmente adicionadas à sua superfície: 35%, 30%, 27,5%, 25%, 20%, 12,5% e 8,6%. O gradiente foi então centrifugado a 210000 xg por 1,5 horas a 4°C e então 20 frações foram coletadas. Cada fração foi precipitada por metanol clorofórmio, e analisada por *western blotting* em gel de poliacrilamida 12%.

A imunoprecipitação também foi feita na tentativa de se observar uma possível interação entre USP2a e STAM. As células foram lisadas com tampão de lise para CO-IP (20 mM Tris-HCL pH 6,8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% de NP40) acrescido de 1 mM dos inibidores de proteases PMSF, fenantrolina e NEM, além de coquetel comercial de inibidores de proteases, por 30 minutos em banho de gelo e, então centrifugadas a

16000 xg durante 15 minutos a 4 °C. O extrato celular foi clarificado pela incubação prévia com 10 µl proteína A/G sepharose (Life) acrescido de 1 µg de igG normal de camundongo durante 3 horas a 4 °C. Após o clareamento, a suspensão foi centrifugada por 5 min a 16000 xg a 4 °C, e metade do sobrenadante obtido foi incubado com uma resina controle e outra metade com uma resina específica durante 16 horas a 4 °C. A resina controle foi obtida pela incubação de 10 µl de proteína A/G sepharose com 1 µg de igG normal de camundongo, já a resina específica foi obtida pela incubação de 10 µl de proteína A/G sepharose com 1 µg de anti-STAM ou anti-Flag. Alternativamente, também foi usada resina comercial de agarose cross-ligada a anti-HA (Thermo). Após o tempo da imunoprecipitação, as matrizes contendo os imunocomplexos ligados foram lavadas 5 vezes com tampão de lise e o material que permaneceu ligado foi eluído com 20 µl de tampão não redutor a 95 °C durante dez minutos. As amostras foram analisadas por *western blotting*, em gel de poliacrilamida 10%.

Para analisar o efeito da superexpressão de USP2a em STAM, células RWPE-1/LNCaP que superexpressam a forma selvagem ou cataliticamente inativa, bem como o vetor vazio, foram plaqueadas a 5×10^5 células por P60, e então transfectadas, após 24h/48h do plaqueamento, com 1,5 µg do plasmídeo pcDNA-Ubiquitina-HA, 3 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) em 500 µL de meio Opti-MEM. Após 48h de transfecção as células foram lisadas com tampão de lise para CO-IP, conforme descrito anteriormente. O extrato celular também foi clarificado com 10 µl proteína A/G sepharose (Life) acrescido de 1 µg de igG normal de camundongo, por 2 horas a 4 °C. Após o clareamento, a suspensão foi centrifugada por 5 min a 16000 xg a 4 °C, e metade do sobrenadante obtido (200 µg) foi incubado com uma resina controle, 10 µl de A/G sepharose com 1 µg de igG normal, e outra metade com uma resina específica, 10 µl de A/G sepharose com 1 µg de anti-STAM, durante 16 horas a 4 °C. As resinas foram lavadas 3 vezes com tampão de lise e o material que permaneceu ligado foi eluído com 20 µl de tampão não redutor, incubados a 95 °C durante dez minutos. As amostras foram analisadas por *western blotting*, em gel de poliacrilamida 15%.

3.8 RECICLAGEM DE EGFR EM CÉLULAS SILENCIADAS PARA STAM

A análise da reciclagem de EGFR foi feita em células LNCaP e RWPE-1 silenciadas para a expressão de STAM, bem como seus controles scramble.

Para isso, as células foram plaqueadas a 5×10^5 células em P60, e então transfectadas, após 24h do plaqueamento para RWPE-1 e 48h para LNCaP, com 1,5 µg do plasmídeo pDEST-USP2aWT-Flag (GRANER *et al.*, 2004), 3 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen), em 500 µL de meio Opti-MEM. O meio de transfecção foi então adicionado às células, já em meio de cultivo sugerido pela ATCC conforme a linhagem, e o nível de expressão de EGFR foi observado por *western blotting*, conforme protocolo descrito anteriormente. Após 24h de transfecção as células foram lisadas com tampão RIPA acrescido de 1mM de PMSF, fenantrolina e NEM, além de coquetel comercial de inibidores de proteases (Thermo), por 30 minutos em banho de gelo, e então centrifugadas a 16000 xg durante 15 minutos a 4° C. Os extratos celulares tiveram sua concentração proteica determinada pelo método de Bradford, e cerca de 10 µg/poço foram aplicados em gel de poliacrilamida 12%.

3.9 INIBIÇÃO GENÉTICA DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE (FASN)

A análise do efeito da inibição genética da enzima FASN em tumores de próstata foi feita em um modelo murino com *knockout* (KO) específico dessa enzima na próstata dos animais. Para isso foi utilizado o sistema Cre-Lox de recombinação, que se baseia na ação da enzima Cre, uma DNA recombinase específica que atua em regiões específicas do DNA genômico, chamadas sequências loxP. Como a deleção sistêmica de um gene pode ser letal ao organismo, esse sistema é bastante empregado para gerar alterações direcionadas a órgãos específicos, como nesse caso a próstata. A indução da Cre recombinase deu-se através da maturação sexual dos animais, devido ao andrógeno endógeno dos camundongos, a testosterona.

Camundongos C57Bl6/SVJ-129 machos $Pten^{wt/loxP}/Fasn^{wt/loxP}/Pb-Cre^+$ e fêmeas $Pten^{wt/loxP}/Fasn^{wt/loxP}/Pb-Cre^-$ foram cruzados, de modo a gerar camundongos duplo KO para Fasn e Pten na próstata. Os seguintes grupos foram estabelecidos:

- $Pten^{loxp/loxp} PbCre^+$ (grupo Pten) de 12 semanas
- $Fasn^{loxp/loxp} PbCre^+$ (grupo Fasn) de 12 semanas
- $Pten^{loxp/loxp}/FASN^{loxp/loxp} PbCre^+$ (grupo Fasn/Pten) de 12 semanas
- $Pten^{loxp/loxp} PbCre^+$ (grupo Pten) de 40 semanas
- $Fasn^{loxp/loxp} PbCre^+$ (grupo Fasn) de 40 semanas
- $Pten^{loxp/loxp}/FASN^{loxp/loxp} PbCre^+$ (grupo Fasn/Pten) de 40 semanas

Através de imunohistoquímica a eficiência do KO dos genes foi avaliada, utilizando-se anticorpos para PTEN, FASN e Akt fosforilada (p-Akt). A análise através de coloração Hematoxilina-Eosina (H&E) também foi empregada, auxiliando na análise do fenótipo tumoral estabelecido. Para ambas as análises os animais foram eutanasiados com 12 e 40 semanas de idade, conforme o grupo de estudo, e tiveram a próstata removida. Com auxílio de lupa, os quatro lobos da próstata foram separados: lobo anterior, lobo lateral, lobo ventral e lobo dorsal. Após pesagem e medição das dimensões, os lobos foram emblocados em parafina para análise histoquímica.

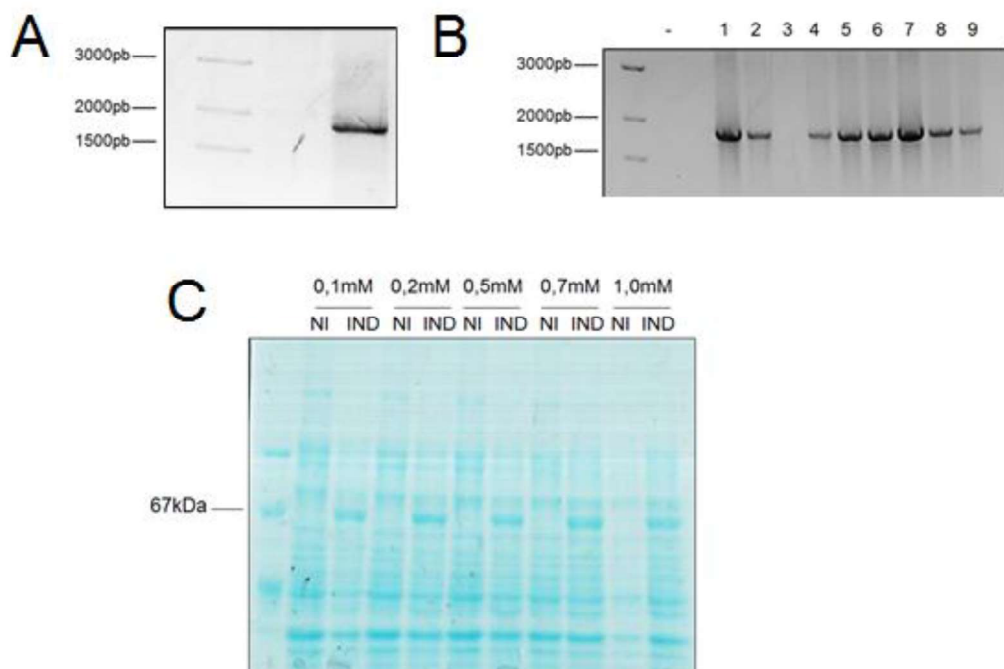
A deleção do gene *Fasn* não foi homogênea em todo o tecido, formando um padrão quimérico. Portanto, a análise da carcinogênese estabelecida no tecido, feita por H&E, deu-se apenas nas áreas em que houve recombinação para *Fasn* ou *Fasn/Pten*. Além disso, um sistema de avaliação foi determinado para quantificar a eficiência do KO de *Fasn* nos grupos, em que cada glândula dentro de um determinado lobo foi analisada e classificada em quatro diferentes grupos: grupo A, com 0 a 25% das células positivas para expressão de FASN; grupo B, com 25% a 50% das células positivas para expressão de FASN; grupo C, com 50% a 75% das células positivas para expressão de FASN; e grupo D, com 75% a 100% das células positivas para expressão de FASN. As áreas foram delimitadas e analisadas pelo software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD).

4. RESULTADOS

4.1. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE USP2a

Após reações de PCR, foi obtido um produto de cerca de 1820 pb referente a sequência da USP2a, conforme pode ser observado na figura 3A. O fragmento foi digerido com as enzimas *NheI* e *HindIII* e submetido ao processo de ligação com o vetor pET28a(+). Após a reação de ligação, o produto foi utilizado para transformar bactérias eletrocompetentes da estirpe DH5α de *E. coli*, e os clones crescidos em meio seletivo foram então usados para realização de uma PCR de colônia para confirmar a presença do inserto de interesse (Figura 3B). Das colônias positivas selecionou-se uma para a realização da purificação plasmidial em pequena escala e então sequenciamento da sequência de DNA. Confirmada a correta clonagem do gene de interesse, partiu-se para a expressão em pequena escala da proteína USP2a6His (figura 3C).

FIGURA 3 - CLONAGEM E EXPRESSÃO DE USP2a6His



FONTE: O autor (2016).

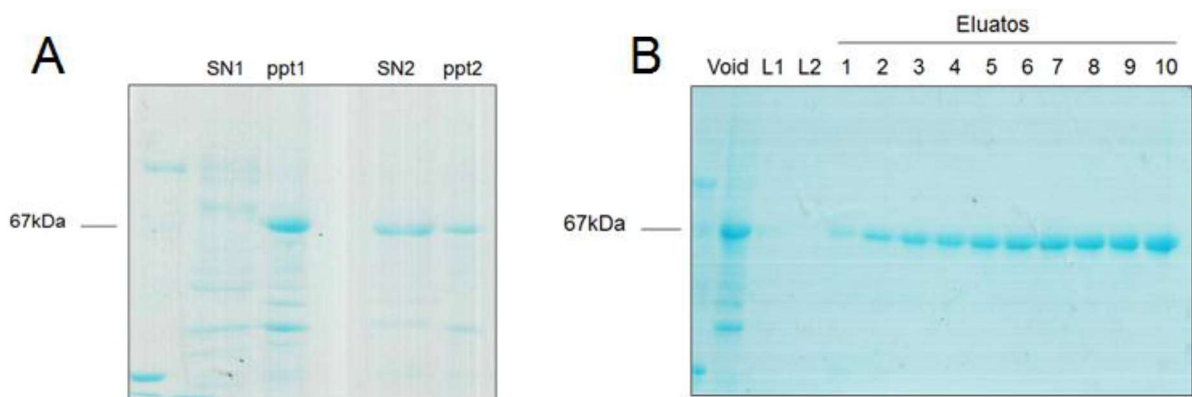
NOTA: A, B) Perfil eletroforético em gel de agarose 1% do produto amplificado por PCR usando como molde plasmídeo pDEST-USP2a. C) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 10% de bactérias *E. coli* do tipo BL21(DE3)STAR expressando ou não USP2a sob diferentes concentrações de IPTG.

LEGENDA: A) O uso de DNA molde e iniciadores específicos nas condições de PCR descritas gerou uma banda de DNA de 1820pb, como esperado. B) O controle negativo (linha -) representa a PCR com bactérias que cresceram em meio seletivo apesar de terem sido transformadas com o plasmídeo ligado sem inserto. Diversas colônias de bactérias transformadas foram analisadas (linhas 1 a 9). M: GeneRuler 1kb DNA Ladder. C) Os resultados representam o extrato total de proteínas extraídas de células induzidas (linhas IND) ou não (linha NI) por 3 horas com concentrações de 0,1mM a 1mM de IPTG. M: LMW-SDS marker kit.

Verifica-se que a expressão da UPS2a6His foi eficiente, tendo em vista que esse polipeptídeo apresenta uma massa molecular prevista de 70 kDa e uma banda com mesmo perfil eletroforético é diferencialmente expresso apenas nas culturas que foram incubadas com IPTG. Apesar de todas as concentrações de IPTG levarem a expressão da proteína de interesse, optou-se por trabalhar a 0,2mM de IPTG.

Estabelecidos os parâmetros de expressão de USP2a em bactérias, foi feita uma expressão em larga escala baseada em tais parâmetros. Após lise por cisalhamento em prensa de French, foi feita uma análise da presença de proteína no lisado celular (Figura 4).

FIGURA 4 - ANÁLISE DO LISADO DE CÉLULAS BACTERIANAS EXPRESSANDO USP2a6His



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 10% de bactérias expressando USP2a6His após lise mecânica em prensa de French, com solubilização de corpos de inclusão por agente caotrópico.

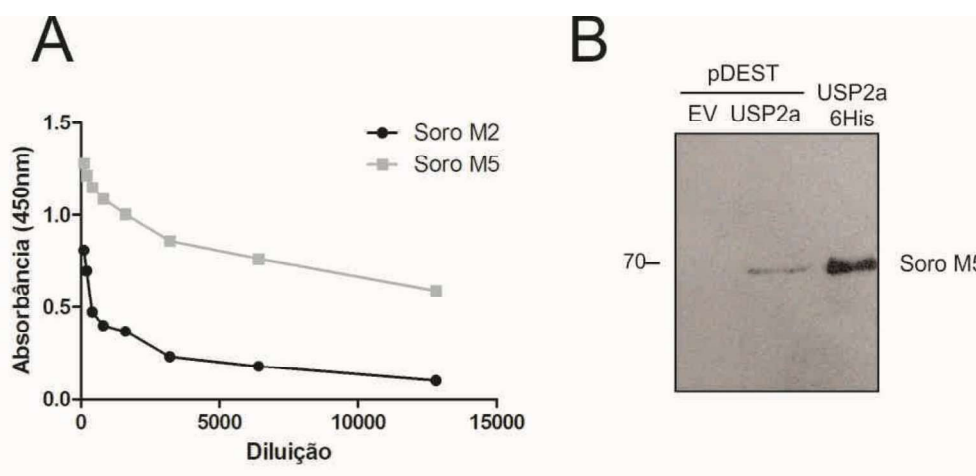
LEGENDA: A) Análise do sobrenadante do lisado celular (linha SN1) e do sedimento do lisado (linha ppt1). Após solubilização do sedimento do lisado com agente caotrópico, análise do sobrenadante (linha SN2) e do sedimento (linha ppt2) obtidos. B) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 10% da purificação de USP2a por cromatografia de afinidade a metal imobilizado níquel (IMAC). Produto não ligado a resina (linha VOID) e os eluatos (linhas 1 a 10) apresentam o resultado da purificação. As linhas L1 e L2 são os tampões de lavagem após passagem na resina, e representam produtos que foram lavados em concentração mais baixa de imidazol que os eluatos (20mM e 300mM, respectivamente). M: LMW-SDS marker kit

Analisando o lisado das células bacterianas, pode-se verificar que no sobrenadante não há proteína na altura da USP2a, em 70 kDa, apesar de haver outras proteínas em diferentes alturas. Entretanto, no sedimento do lisado há uma banda em 70 kDa, mais forte em relação às outras bandas presentes neste sedimento, sugerindo que a USP2a está sendo expressa de maneira insolúvel em corpos de inclusão. Fez-se necessária, então, sua solubilização com agente caotrópico, uréia 8M, para posterior purificação da proteína. Pode ser observado que a solubilização foi adequada, pois o sobrenadante do lisado (linha SN2) possui uma banda proeminente de 70 kDa, a qual é compatível com a massa molecular esperada da USP2a. Além disso, o sedimento apresenta um resquício de USP2a não solubilizada, mas insignificante se comparado à proteína solubilizada presente no sobrenadante. Pelo perfil eletroforético após a purificação, verifica-se que ainda há proteína que não se ligou a matriz cromatográfica, pois se observa banda de ca. 70 kDa na fração Void. Entretanto, não há perda de proteína que se desligou da resina com o tampão de lavagem, e a eluição com 300 mM de imidazol foi eficiente na remoção da proteína da resina, além de haver um bom nível de pureza nas frações eluídas (Eluatos). Após diálise e quantificação protéica, verificou-se um rendimento de cerca de 0,2 µg de proteína recombinante purificada por mL de cultivo bacteriano.

4.2 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS REATIVOS A USP2a

A produção de anticorpos anti-USP2a foi feita em camundongos e coelhos, sendo esse último realizado por uma empresa especializada devido à ausência de coelhário disponível para uso. A análise dos soros hiperimune produzidos em camundongos mostrou que a proteína recombinante foi eficiente na geração de resposta humoral e os anticorpos policlonais foram eficientes tanto no reconhecimento do antígeno recombinante USP2a6His quanto na USP2a expressa em células de mamíferos, através de transfecção com o plasmídeo pDEST-USP2aFlag (figura 5).

FIGURA 5 – OBTENÇÃO DE ANTICORPOS REATIVOS A USP2a



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Análise dos anticorpos policlonais obtidos após imunização de camundongos com USP2a6His.

LEGENDA: A) titulação por ELISA de dois soros hiperimune de camundongo obtidos após as imunizações, utilizando-se USP2a6His como antígeno da reação. B) Reconhecimento do soro M5 por *Western blotting* da proteína USP2a6His recombinante e da USP2a-Flag expressa em células HEK-293T após transfecção com o plasmídeo pDEST-USP2aFlag. A linha EV indica extrato de células HEK-293T transfectadas com o vetor vazio pDEST que, portanto, não superexpressam USP2a.

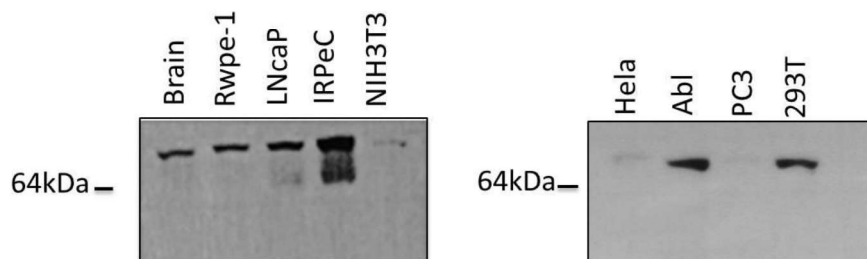
Os animais foram utilizados como doadores de esplenócitos para a produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais, e cerca de 40 clones foram selecionados, entretanto nenhum clone estável foi isolado, pois os hibridomas pararam de secretar anticorpos após a primeira diluição limitante. Além disso, a USP2a6His também foi empregada na varredura de hibridomas secretores de anticorpos anti-USP2a obtidos em colaboração com o grupo do Dr. Massimo Loda, nosso colaborador do Dana-Farber Cancer Institute, mas da mesma forma nenhum clone estável foi isolado.

Já o soro produzido em coelhos, apesar de ser capaz de reagir com a proteína recombinante USP2a6His tanto em ensaios de ELISA como *western blotting*, não foi capaz de se ligar à proteína USP2a superexpressa em células de mamíferos (HEK293 e HeLa transfectadas com pDEST-USP2aFlag, dados não mostrados). Desse modo, os estudos com USP2a prosseguiram utilizando-se anticorpos anti-tag, como anti-HA e anti-Flag.

4.3 ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS DE PRÓSTATA COM SUPEREXPRESSÃO DE USP2a

Para estudar a interação entre STAM e USP2a procurou-se inicialmente determinar qual seria o melhor modelo celular que apresentava abundância relativa das duas moléculas capaz de ser detectada pelas metodologias corriqueiramente utilizadas pelo grupo, tipicamente reações de imunoprecipitação seguidas de detecção por *western blotting*. Assim diferentes linhagens celulares foram analisadas quanto à expressão endógena de STAM (figura 6). Verifica-se que das linhagens tumorais IRPeC expressa STAM em maior quantidade, porém devido ao alto custo de manutenção dessa linhagem optou-se por não utilizá-la. Observa-se que tanto LNCaP quanto RWPE-1 tem alta expressão dessa proteína, além de serem linhagens humanas tumoral e normal de próstata, respectivamente, mostrando-se serem adequadas tanto como modelo experimental como aos interesses conjuntos dos grupos de pesquisa envolvidos nesta iniciativa colaborativa.

FIGURA 6 - EXPRESSÃO DE STAM EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES



FONTE: O autor (2016).

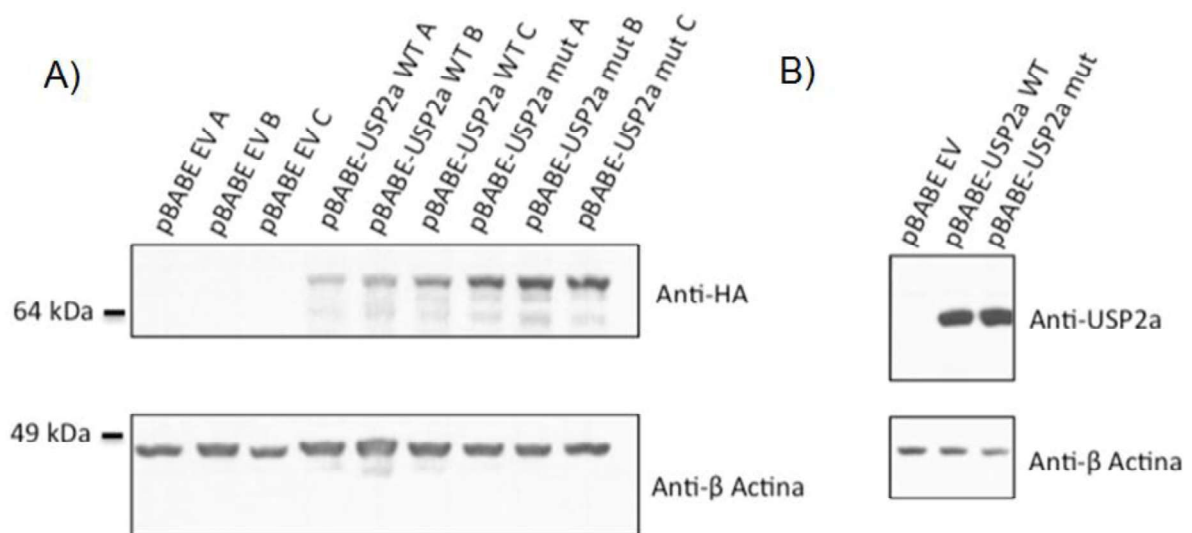
NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 10% de lisados de diferentes linhagens celulares e de cérebro de camundongo.

LEGENDA: Expressão de STAM avaliada em oito linhagens celulares: Linhagens normais de próstata (RWPE-1 e IRPeC), linhagens tumorais de próstata (LNCaP, Abl e PC3), linhagem de fibroblasto murino (NIH/3T3), linhagem renal embrionária humana (HEK-293T) e em linhagem tumoral de cervix (HeLa). Também foi usado tecido nervoso de camundongo como controle positivo sugerido na bula do anticorpo utilizado. A reação de *Western blotting* foi conduzida com 20 µg de extrato, usando-se anticorpo anti-STAM1 (CST).

Com o uso de vetor retroviral como ferramenta para a introdução de genes, ambas as linhagens foram permanentemente transformadas com o vetor pBABE para expressar USP2a-HA selvagem e o mutante cataliticamente inativo (Cys276Ala).

As infecções retrovirais foram feitas em triplicatas, e após seleção em meio com puomicina foram estabelecidas seis linhagens: LNCaP-EV, expressando o vetor pBABE vazio; LNCaP-USP2aWT, expressando a forma selvagem da enzima; LNCaP-USP2aMUT, expressando o mutante cataliticamente inativo de USP2a; RWPE-1-EV, expressando o vetor pBABE vazio; RWPE-1-USP2aWT, expressando a forma selvagem da enzima; e RWPE-1-USP2aMUT, expressando o mutante cataliticamente inativo de USP2a. A expressão das construções de interesse foi evidenciada por reação de *wester blotting* empregando-se anticorpos específicos. A figura 7 representa os resultados obtidos com a linhagem RWPE-1, resultados similares foram observados com a linhagem LNCaP e para evitar repetição não são mostrados aqui.

FIGURA 7 - SUPEREXPRESSÃO DE USP2aHA EM LINHAGEM CELULAR DE PRÓSTATA



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 10% de lisados de células RWPE-1 superexpressando USP2aHA cataliticamente ativa ou não.

LEGENDA: A) Infecção retroviral de células RWPE-1 expressando USP2a selvagem (pBABE-USP2a WT) e seu mutante cataliticamente inativo (pBABE-USP2a MUT) feitas em triplicatas (A, B e C). O controle vetor vazio (pBABE EV) também é mostrado. B) Após seleção com puomicina e estabelecimento das

linhagens em cultivo, as células foram novamente testadas quanto ao nível de expressão de USP2aHA, que se manteve adequado. As reações foram feitas com 20 µg de lisado e com anticorpos anti-USP2a policlonal murino (produzido em nosso laboratório), anti-HA (BioLegend), e anti-Actina (Sigma).

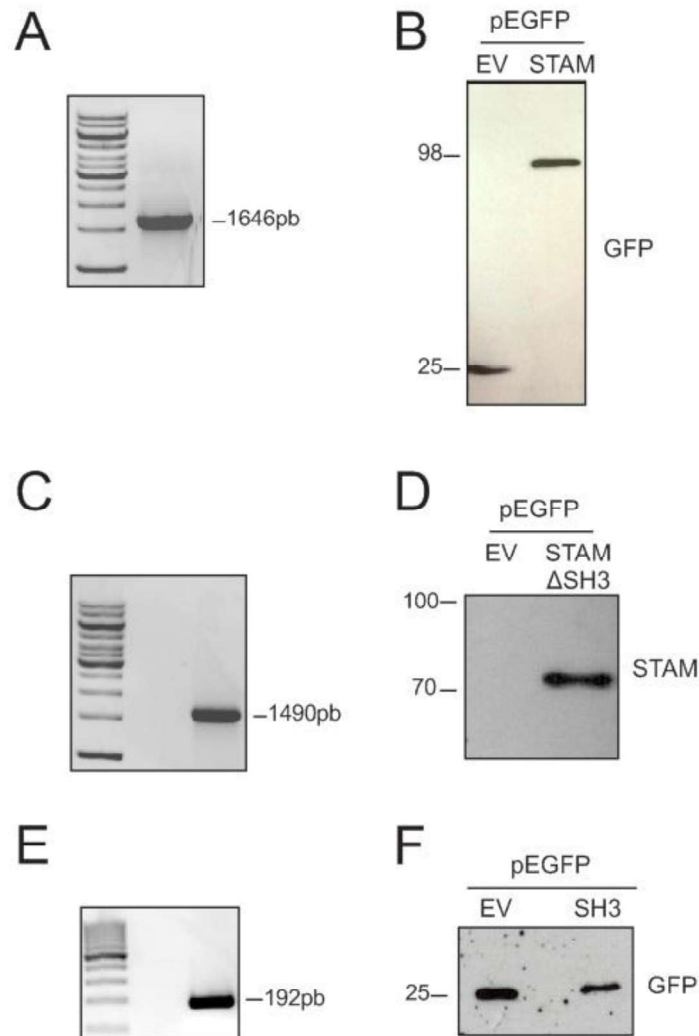
4.4 CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO DE STAM E SEUS MUTANTES

A proteína STAM foi clonada no vetor de expressão pEGFP (Clontech) uma vez que possuir etiqueta distinta daquela utilizada para obtenção das linhagens expressando USP2a (HA, ver acima) seria importante em experimentos futuros de co-expressão dos dois parceiros moleculares (STAM/USP2a) na mesma célula (ver abaixo). A região SH3 de STAM já foi descrita como um sítio de interação com as deubiquitinases, AMSH e USP8, portanto duas formas mutantes de STAM foram clonadas: pEGFP-SH3, que expressa apenas a região SH3 de STAM, e pEGFP-STAM Δ SH3 que expressa a sequência de STAM com a região SH3 deletada.

A forma selvagem de STAM foi clonada amplificando-se por PCR a região de interesse do gene com iniciadores oligonucleotídicos específicos, gerando um fragmento de 1646 pb (figura 8A). Após transfecção em linhagens MCF-7, uma proteína com cerca de 87 kDa foi obtido em reação com anti-GFP, a massa molecular esperada da fusão de GFP com STAM1 (figura 8B). Essa linhagem foi inicialmente usada por não estar disponível no laboratório as linhagens de próstata LNCaP e RWPE-1. Como a bula do anticorpo anti-STAM1 (CST) mostra alta expressão dessa proteína em linhagem MCF-7, decidiu-se utilizá-la para os teste iniciais dos construtos.

A forma de STAM com a região SH3 deletada também foi amplificada por PCR, gerando um fragmento de 1481 pb (figura 8C). Após transfecção em linhagem LNCaP, uma proteína com aproximadamente 80 kDa e a massa molecular compatível com o mutante esperado, foi obtido e evidenciado por reação com anti-STAM1 (figura 8D). Já a clonagem da região SH3 no vetor pEGFP foi feita amplificando-se a sequência por PCR, e um inserto de cerca de 192 pb foi obtido (figura 8E). Após transfecção em linhagem LNCaP foi obtida uma químera com 34 kDa a qual foi detectada com anti-GFP e coincidia com a massa molecular esperada para a proteína de fusão GFP-SH3 (figura 8F).

FIGURA 8 - CLONAGEM MOLECULAR E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA STAM



FONTE: O autor (2016).

NOTA: A, C, E) Perfil eletroforético em gel de agarose 1% do produto amplificado por PCR. B, D, F) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% de células transfectadas com o vetor pEGFP vazio ou contendo sequência de STAM e seus mutantes.

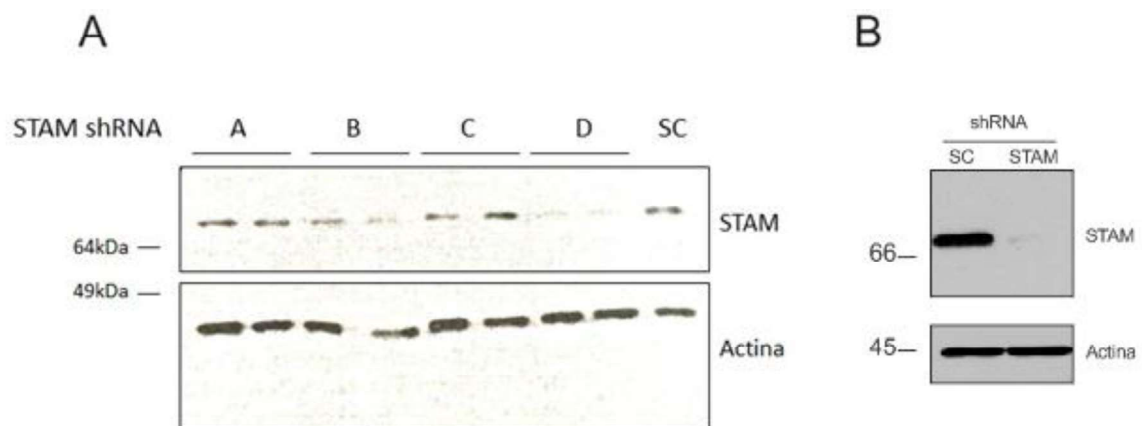
LEGENDA: A) Amplificação por PCR da sequência que codifica para STAM selvagem. B) Expressão de STAM-GFP e o controle vetor vazio (EV) em células MCF-7. C) Amplificação por PCR da sequência que codifica para STAM com a região SH3 deletada. D) Expressão de STAM Δ SH3-GFP e o controle vetor vazio (EV) em células LNCaP. E) Amplificação por PCR da sequência que codifica para a região SH3 de STAM. F) Expressão de SH3-GFP e o controle vetor vazio (EV) em células LNCaP. As reações de *western blotting* foram feitas utilizando-se 20 μ g de lisado celular e anticorpo anti-GFP (CST) e anti-STAM1 (CST).

4.5 SILENCIAMENTO DE STAM EM LINHAGENS CELULARES DE PRÓSTATA

Para verificar o papel de STAM em recrutar USP2a aos endossomos precoces, linhagens de próstata LNCaP e RWPE-1 foram infectadas com retrovírus contendo vetores de silenciamento (pRS-shRNA) para STAM a fim de se obter linhagens com baixa expressão dessa proteína. Diferentes shRNAs foram testados, e a expressão final de STAM foi determinada por reação de *western blotting* (figura 9). A figura representa os resultados obtidos com a linhagem LNCaP, resultados similares foram obtidos com RWPE-1 e para evitar repetição não são mostrados aqui.

Observa-se que para a sequência do shRNA D os resultados foram melhores se comparado às demais sequências, inclusive o controle shRNA *scramble* (figura 9A), de modo que linhagens infectadas com esse shRNA foram estabelecidas (figura 9B).

FIGURA 9 - SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO DE STAM EM LINHAGEM CELULAR DE PRÓSTATA



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 10% de células LNCaP transformadas com diferentes shRNAs para reduzir a expressão de STAM.

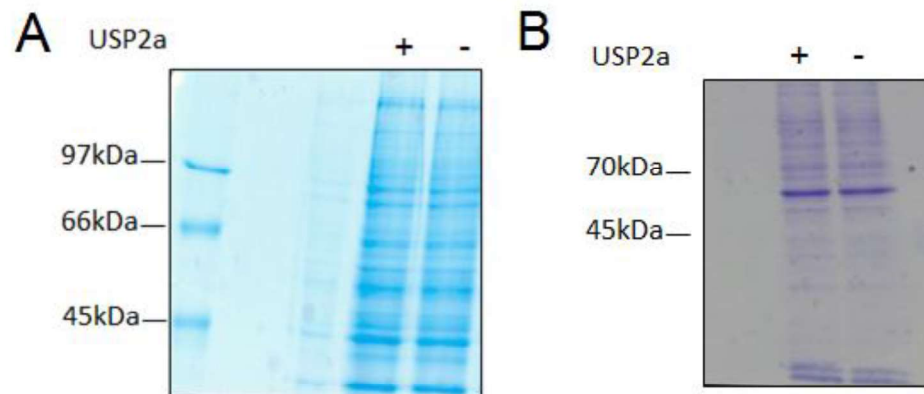
LEGENDA: A) Expressão de STAM avaliada nas células LNCaP infectadas com retrovírus e quatro diferentes sequências de shRNA específicas para STAM, além do controle shRNA Scramble. B) Após seleção com puromicina e estabelecimento das linhagens em cultivo, as células foram novamente testadas quanto ao nível de expressão de STAM, que se manteve baixo. As reações foram feitas com 20 µg de lisado e com anticorpos anti-STAM1 (CST), e anti-Actina (Sigma).

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS MOLECULARES DE USP2a

Para a identificação de possíveis parceiros moleculares de USP2a, decidiu-se realizar ensaio de pull-down através da imobilização de USP2a6His em resina de níquel-agarose, com posterior incubação com lisado de células HeLa. Essas células foram escolhidas devido ao estudo de Liu e colaboradores de 2013, em que foi observada a co-localização de USP2a e EEA1 nesta linhagem. A comparação do padrão de bandas obtidos através da presença ou não da deubiquitinase poderia levar ao enriquecimento diferencial de proteínas com afinidade relativa a USP2a, podendo as mesmas serem identificadas por espectrometria de massas. Essa foi a mesma abordagem utilizada na identificação de FASN como substrato de USP2a, e o mesmo protocolo foi seguido (GRANER *et al.*, 2004).

Através do ensaio de pull-down (figura 10) pode-se observar que o padrão de proteínas que se ligaram às resinas é similar tanto na presença quanto na ausência de USP2a. Aparentemente, houve ligação inespecífica de proteínas do extrato celular na resina de agarose. Para contornar esse problema, as lavagens das resinas foram feitas com tampão de lise, entretanto não foram observadas alterações. As incubações foram feitas então na presença de 5mM de imidazol, e a lavagem da resina foi feita com 10mM de imidazol em tampão de lise, para aumentar a exigência do protocolo (figura 10B). Apesar da presença de imidazol diminuir ligeiramente o número de proteínas ligadas à resina, ainda há um número muito grande de ligações inespecíficas.

FIGURA 10 - PULL-DOWN COM USP2a6HIS E EXTRATO DE CÉLULAS HeLa



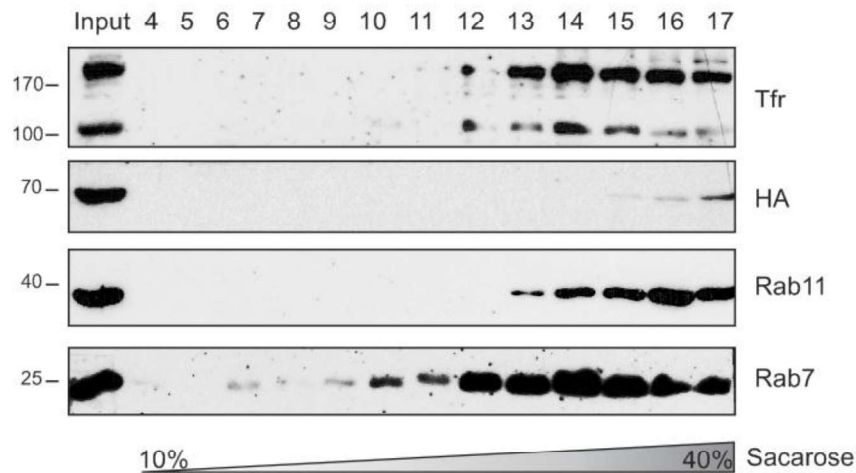
FONTE: O autor (2016).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 10% de pull-down feito na presença ou ausência de USP2a6His.

LEGENDA: A) Extrato total de células HeLa incubado com resinas de níquel-agarose com (lanes +) e sem (lanes -) USP2a. Observa-se que o padrão de proteínas em ambas as condições é similar. B) Pull-down realizado na presença de 5mM de imidazol para minimizar ligações inespecíficas, além de lavagem da resina com 10mM de imidazol. Ainda se observa que o padrão de proteínas em ambas as condições é similar.

Para reduzir a quantidade de ligantes, decidiu-se não usar o extrato total de células na incubação, mas sim apenas a fração correspondente aos endossomos precoces, onde se presume estar os parceiros moleculares de USP2a (LIU et al., 2013), proteínas do ESCRT-0, como STAM. Para isolamento dos endossomos utilizou-se a separação por densidade baseada em sacarose (figura 11).

FIGURA 11 – ISOLAMENTO DE ENDOSSOMOS PRECOSES E TARDIOS



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 15% de diferentes frações obtidas por ultracentrifugação com gradiente de densidade baseado em sacarose visando isolamento de endossomos precoces e tardios em células LNCaP superexpressando USP2aHA.

LEGENDA: As 14 frações analisadas foram reagidas com diferentes anticorpos: anticorpo para marcadores de endossomos precoces (Receptor de transferrina, Tfr), para marcadores de endossomos de reciclagem (Rab11), e para marcadores de endossomos tardios (Rab7). Além disso, anticorpo anti-HA foi usado para detecção de USP2a. A linha input indica o lisado total, servindo como controle para todos os marcadores utilizados. As reações foram feitas com 20 µg de lisado e com anticorpos anti-Tfr (Abcam), anti-HA (BioLegend), anti-Rab11 (Invitrogen) e anti-Rab7 (CST).

Como esperado, a USP2a foi encontrada nas frações mais densas do gradiente, assim como o marcador de endossomos precoces receptor de transferrina. Entretanto a separação não foi ideal, pois ainda há uma considerável presença de Rab7, marcador de endossomos tardios, nas frações em que a USP2a se encontra. Interessantemente o marcador Rab11, relacionado com endossomos de reciclagem lenta, também foi encontrado predominantemente nas frações mais densas do gradiente. A importância de enzimas deubiquitinases no transporte de proteínas de endossomos de reciclagem à membrana plasmática já foi observada, sabe-se, por exemplo, que a proteína transportadora de glutamato GLT-1 tem sua volta à membrana bloqueada na presença de um inibidor da deubiquitinase UCH-L (MARTINEZ-VILLARREAL *et al.*, 2012).

O uso das frações mais densas do gradiente de sacarose, porém, não surtiu efeito na melhoria do pull-down (dados não mostrados). Com a dificuldade em se estabelecer um protocolo adequado, decidiu-se, com base nos dados da literatura,

analisar a interação de STAM e USP2a. A análise da sequência de aminoácidos da USP2a revela regiões que poderiam interagir com STAM, como regiões ricas em prolina e RXXK, já descrita na interação de STAM com AMSH (figura 12). Observa-se, porém, que sequências clássicas de interação com regiões SH3, PXXP, não foram encontradas, apenas regiões ricas em prolina em que os aminoácidos estão separados por um ou três aminoácidos diferentes.

FIGURA 12 – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA USP2a HUMANA

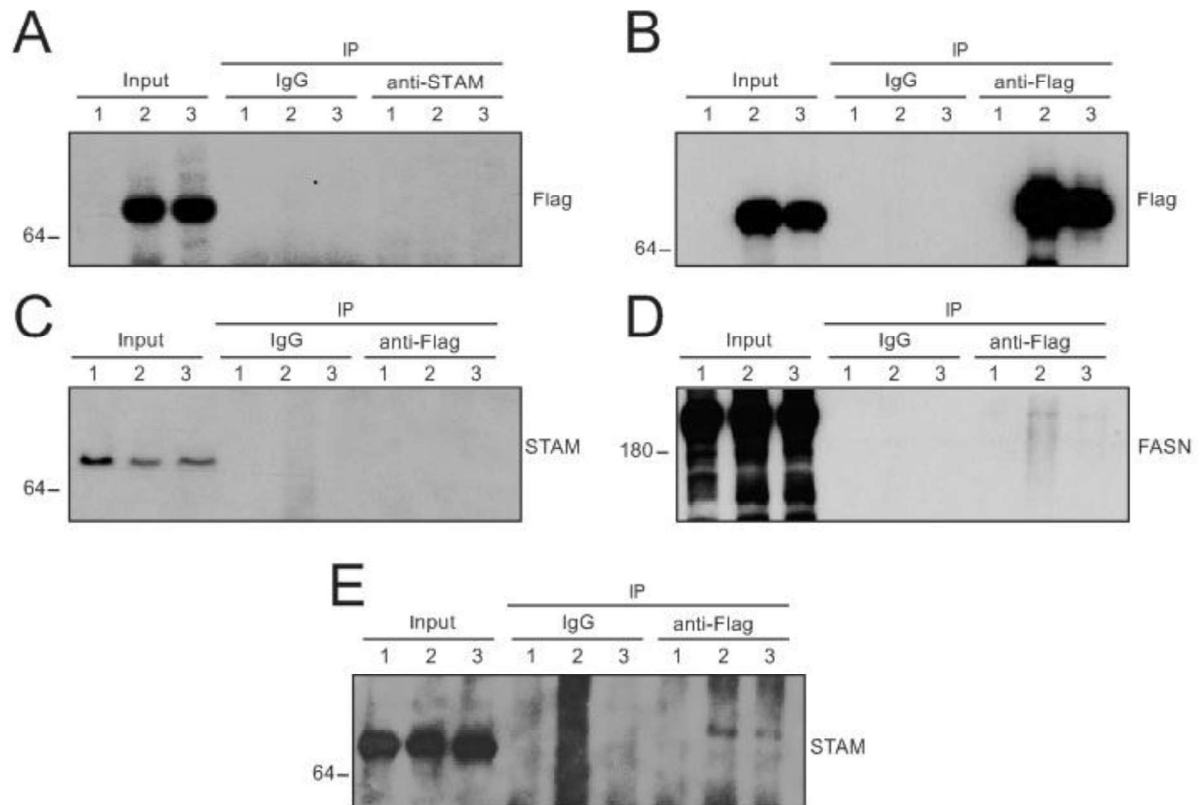
MSQLSSTLKR	YTESARYTDA	HYAKSGYGAY	TPSSYGANLA	ASLLEKEKLG	FKPVPTSSFL	61
TRPRTYGPSS	LLDYDRGRFL	LRFDITGGGK	RAESQTRGTE	RPLGSGLSGG	SGFPYGVINN	121
CLSYLPINAY	DQGVTLTQKL	DSQSDLARDF	SSLRTSDSYR	IDPRNLGRSP	MLAETRKELC	181
TLQGLYQTAS	CPEYLVLDYLE	NYGRKGSASQ	VPSQAPPSRV	FEIISPTYRP	IGRYTLWETG	241
KGQAEGPSRS	SSPGRDGMNS	KSAQGLAGLR	NLGNTCFMNS	ILQCLSNTRE	LRDYCLQRLY	301
MRDLHHGSNA	HTALVEEFAK	LIQTIWTSSP	NDVVSPPSEFK	TQIQRYAPRF	VGYNQQDAQE	361
FLRFLLDGLH	NEVNRVTLR	KSNPENLDHL	PDDEKGRQMW	RKYLEREDSR	IGDLFVGQLK	421
SSLTCTDCGY	CSTVFDPFWD	LSLPIAKRGY	PEVTLMDCMR	LFTKEDVLDG	DEKPTCCRCR	481
GRKRCIKKFS	IQRFFPKILVL	HLKRFSESRI	RTSKLTTFVN	FPLRDLDLRE	FASENTNHAV	541
YNLYAVSNHS	GTTMGGHYTA	YCRSPGTGEW	HTFNDSSVTP	MSSSQVRTSD	AYLLFYELAS	601
PPSRM						

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Sequencia de aminoácidos da USP2a humana, com regiões preditas de interação com STAM evidenciadas: regiões PXP em amarelo, PXXXP em verde e RXXK em rosa. A sequência foi obtida através da base de dados do NCBI, e o alinhamento feito pelo software ClustalOmega (EMBL-EBI).

Tentativas de verificar essa possível interação foram feitas por ensaio de co-imunoprecipitação. A figura 13 resume os resultados obtidos em células LNCaP transfectadas com pDEST-USP2a.

FIGURA 13 - CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO DE STAM EM LINHAGEM CELULAR DE PRÓSTATA COM SUPEREXPRESSÃO TRANSIENTE DE USP2a



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12% de diferentes ensaios de co-imunoprecipitação estabelecidos em células LNCaP superexpressando USP2aFlag.

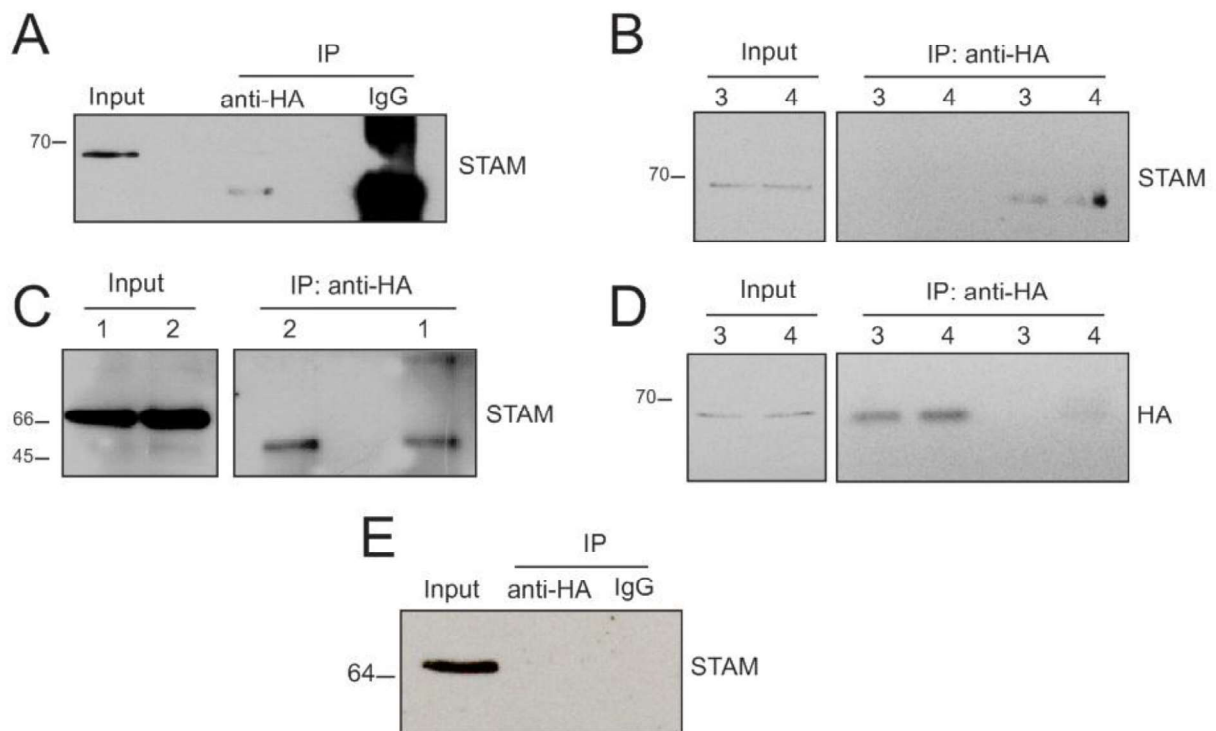
LEGENDA: Linhagem LNCaP transfectada com: pDEST-EV (lanes 1), pDEST-USP2aWT (lanes 2) e pDEST-USP2aMUT (lanes 3). A) Imunoprecipitação de STAM e reação com anti-Flag para detectar USP2a. B) Imunoprecipitação de USP2a com anti-Flag e reação com anti-Flag para confirmar que a imunoprecipitação ocorreu. C) Imunoprecipitação de USP2a com anti-Flag e reação com anti-STAM. D) Imunoprecipitação de USP2a com anti-Flag e reação com anti-FASN como controle do ensaio. E) Imunoprecipitação de USP2a com anti-Flag e reação com anti-STAM, com superexposição do filme radiográfico. Os inputs foram feitos com 20 µg de extrato total.

Inicialmente tentou-se imunoprecipitar STAM para então se detectar USP2a através da sua etiqueta Flag, entretanto pela figura 13A observa-se que o protocolo estabelecido não teve sucesso em confirmar a interação. Imunoprecipitando-se, porém, USP2a pela sua etiqueta Flag, foi possível detectar STAM, figura 13E. Alguns controles do protocolo foram feitos, como reagir a membrana com anti-Flag (figura 13B),

verificando que de fato USP2a foi imunoprecipitada, e com anti-FASN (figura 13D), uma proteína já descrita como substrato da USP2a (GRANER *et al.*, 2004).

Após o estabelecimento das linhagens de próstata expressando permanentemente USP2a-HA, um novo protocolo de co-imunoprecipitação foi estabelecido, utilizando-se beads de agarose cross-ligadas a anti-HA, com o intuito de confirmar o resultado obtido anteriormente (figura 14).

FIGURA 14 - CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO DE STAM EM LINHAGEM CELULAR DE PRÓSTATA COM SUPEREXPRESSÃO PERMANENTE DE USP2a



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12% de diferentes ensaios de co-imunoprecipitação estabelecidos em células LNCaP superexpressando USP2aHA.

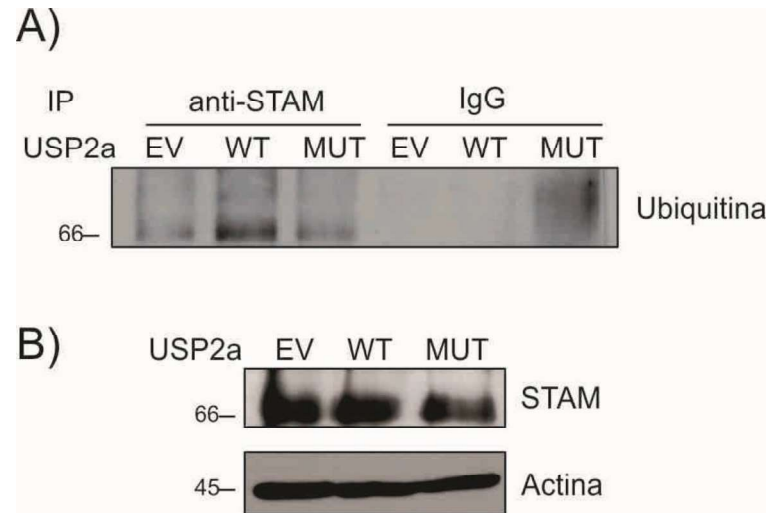
LEGENDA: Linhagens LNCaP-EV (lanes 1) e LNCaP-USP2aWT (lanes 2) usadas no ensaio. As lanes 3 representam a linhagem LNCaP-USP2aWT transfectada com pEGFP-EV, enquanto as lanes 4 representam a linhagem transfectadas com pEGFP-STAM. Todas as reações de imunoprecipitação foram feitas usando-se resina de agarose ligada covalentemente a anti-HA (Thermo), com posterior reação com anti-STAM (CST). Os inputs foram feitos com 20 µg de extrato total.

Na figura 14A tentou-se imunoprecipitar USP2a pela sua tag HA e verificar a presença de STAM, entretanto percebe-se uma grande quantidade de proteína

precipitada no controle de agarose com IgG normal. Alterações no protocolo, como incubação do lisado com as beads por menor tempo, e maior concentração de detergente no tampão de lavagem, foram eficazes em impedir precipitação inespecífica no controle, entretanto também não se observa a presença de STAM na imunoprecipitação com HA. Outras tentativas foram feitas, como utilizar LNCaP-EV e LNCaP-USP2a em incubação com agarose-HA, figura 14C, mas observa-se a presença de STAM para ambas as linhagens, indicando uma provável precipitação inespecífica da proteína. A superexpressão de STAM-GFP em linhagem LNCaP-USP2a, na tentativa de melhorar a co-imunoprecipitação, não apresentou resultado satisfatório uma vez que a proteína quimérica não foi detectada nem mesmo no input, evidenciando um baixo nível de expressão (figura 14B e 14D). Apesar de ter havido imunoprecipitação de USP2a com as beads de agarose-HA (figura 14D), não se verifica a presença de STAM (figura 14B). A expressão dos mutantes de STAM também se mostrou muito baixa, não sendo possível verificar se a região SH3 de STAM de fato interage com a USP2a.

Resolveu-se ainda analisar a influência de USP2a no status de ubiquitinação sobre STAM, já que a hipótese era de que USP2a poderia ligar STAM e provavelmente remover etiquetas de ubiquitina. Para isso fez-se imunoprecipitação de STAM em células expressando a deubiquitinase selvagem ou seu mutante cataliticamente inativo, assim como o vetor vazio de controle, seguida de reação com anti-ubiquitina (figura 15).

FIGURA 15 - EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE USP2a SOBRE A PROTEÍNA STAM



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12% de imunoprecipitação de STAM em células LNCaP superexpressando USP2aHA cataliticamente ativa ou não.

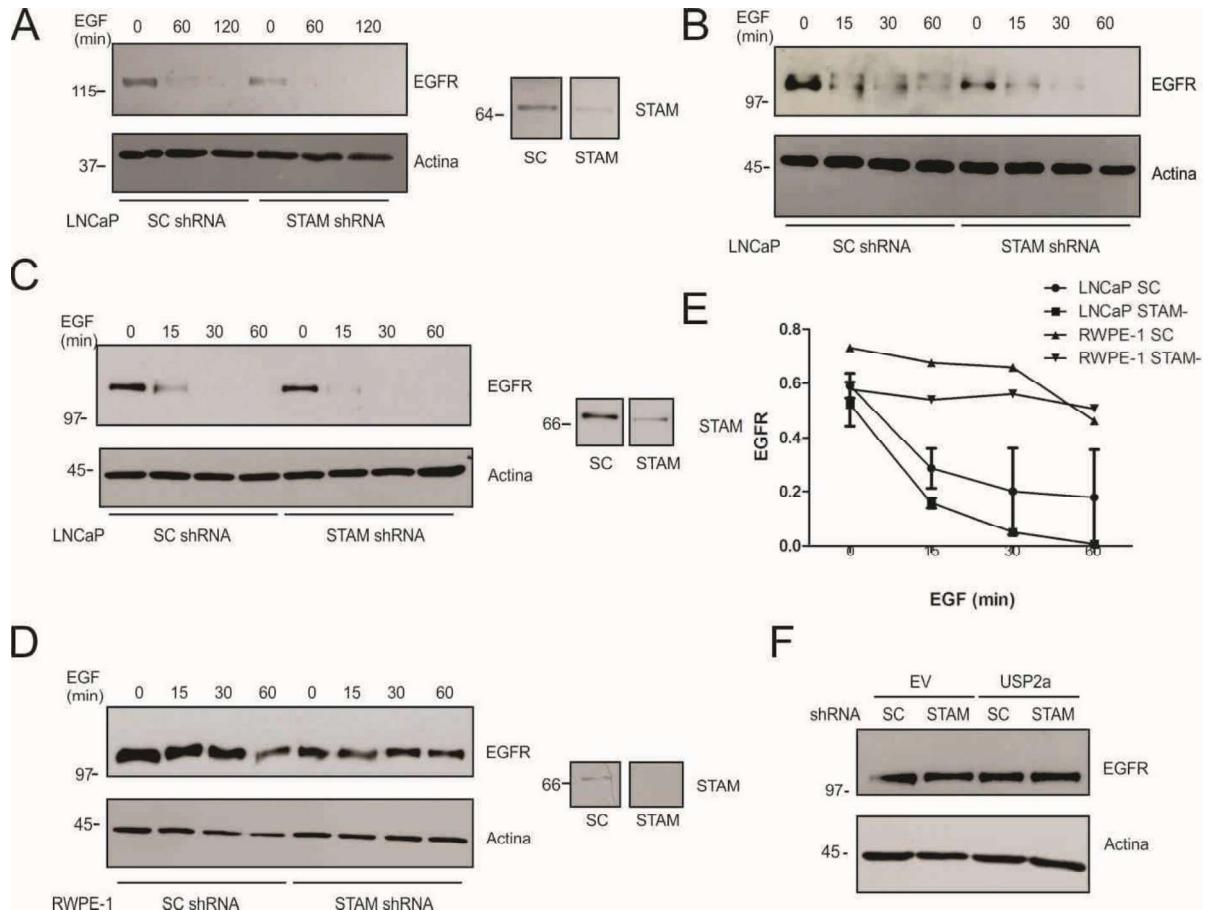
LEGENDA: A) Análise do nível de ubiquitinação de STAM em células que superexpressam a forma selvagem (WT) e o mutante cataliticamente inativo de USP2a (MUT), bem como células que não superexpressam a deubiquitinase (EV). Ensaio feito pela imunoprecipitação de STAM com anticorpo específico, seguido de reação com anti-ubiquitina. B) reação de *western blotting* com 20 µg de lisado total de células LNCaP superexpressando USP2a selvagem (WT), o mutante cataliticamente inativo (MUT) e o controle vetor vazio (EV), para verificar os níveis de expressão de STAM.

Ao contrário do que se supunha a superexpressão da forma selvagem de USP2a leva a um aumento na ubiquitinação de STAM, enquanto o mutante cataliticamente inativo de USP2a parece manter a ubiquitinação da proteína similar a do controle (figura 15A). Analisando os níveis de STAM nas células, porém, verifica-se que não há diferença na quantidade de STAM expressa, indicando que o aumento na marcação da proteína com ubiquitina não deve levá-la à degradação, provavelmente agindo como uma forma de sinalização intracelular (figura 15B).

4.7 RECICLAGEM DE EGFR EM CÉLULAS SILENCIADAS PARA STAM

Para verificar o efeito de STAM na reciclagem do receptor de EGF, células silenciadas para este componente dos ESCRTs foram tratadas com EGF em diferentes intervalos de tempo, e então os níveis de EGFR foram analisados (figura 16).

FIGURA 16 – RECICLAGEM DE EGFR EM CÉLULAS SILENCIADAS PARA STAM



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 10% da expressão de EGFR em células LNCaP, superexpressando USP2aHA, após tratamento com EGF por diferentes tempos.

LEGENDA: A,B,C) Análise da expressão de EGFR em células LNCaP silenciadas (STAM shRNA) ou não (SC shNA) para STAM, frente a estímulo com EGF por diferentes tempos. D) Análise da expressão de EGFR em células RWPE-1 silenciadas (STAM shRNA) ou não (SC shNA) para STAM, frente a estímulo com EGF por diferentes tempos. E) Análise quantitativa dos resultados. F) Nível de expressão de EGFR sem tratamento com EGF, na presença ou ausência de STAM e USP2a. As reações foram feitas com 10 µg de lisado e com anticorpos anti-EGFR (Santa Cruz), anti-STAM (CST) e anti-Actina (Sigma).

É possível verificar na figura 16 que nas linhagens de próstata analisadas (LNCaP, figura 16 A-C, RWPE-1 figura 16 D) a degradação de EGFR é acelerada quando há o silenciamento de STAM se comparado com o controle Scramble shRNA, sendo maior em células LNCaP. Observa-se pelas figuras 16A, B, C e D que no tempo inicial de tratamento com EGF as células silenciadas para STAM parecem possuir uma

menor expressão de EGFR do que o controle. A curva representando a cinética de degradação obtida pelos dados de densitometria das bandas obtidas por WB é apresentada na figura 16E. Comparando o nível de expressão do receptor em células não tratadas com EGF, superexpressando ou não USP2a, figura 16F, verifica-se que não há diferença considerável entre as mesmas.

4.8 INIBIÇÃO GENÉTICA DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE (FASN)

A enzima FASN foi descrita como um importante substrato da USP2a (GRANER et al., 2004). De fato, essa DUB é capaz de estabilizar FASN, impedindo sua degradação, o que foi correlacionado com a agressividade de diferentes tumores humanos, incluindo o tumor de próstata. Desse modo, decidiu-se avaliar o efeito da deleção do gene que codifica para FASN na próstata de camundongos. Para isso animais geneticamente modificados foram desenvolvidos, de modo a serem knockout (KO) para *pten*, para *fasn*, e duplamente para *fasn/pten*. A eficiência de deleção dos genes *fasn* e *pten* foi diferente nos quatro lobos da próstata de camundongos, conforme mostrado na tabela 2.

TABELA 2 – EFICIÊNCIA DO KO DE FASN E PTEN EM PRÓSTATA DE CAMUNDONGOS

Lobo da próstata		<i>fasn</i> KO	<i>Pten</i> KO	<i>fasn/Pten</i> KO
	Anterior	13,3	83,3	50
	Dorsal	0	100	13,3
	Lateral	66,6	100	83,3
	Ventral	66,6	100	86,6

FONTE: O autor (2016).

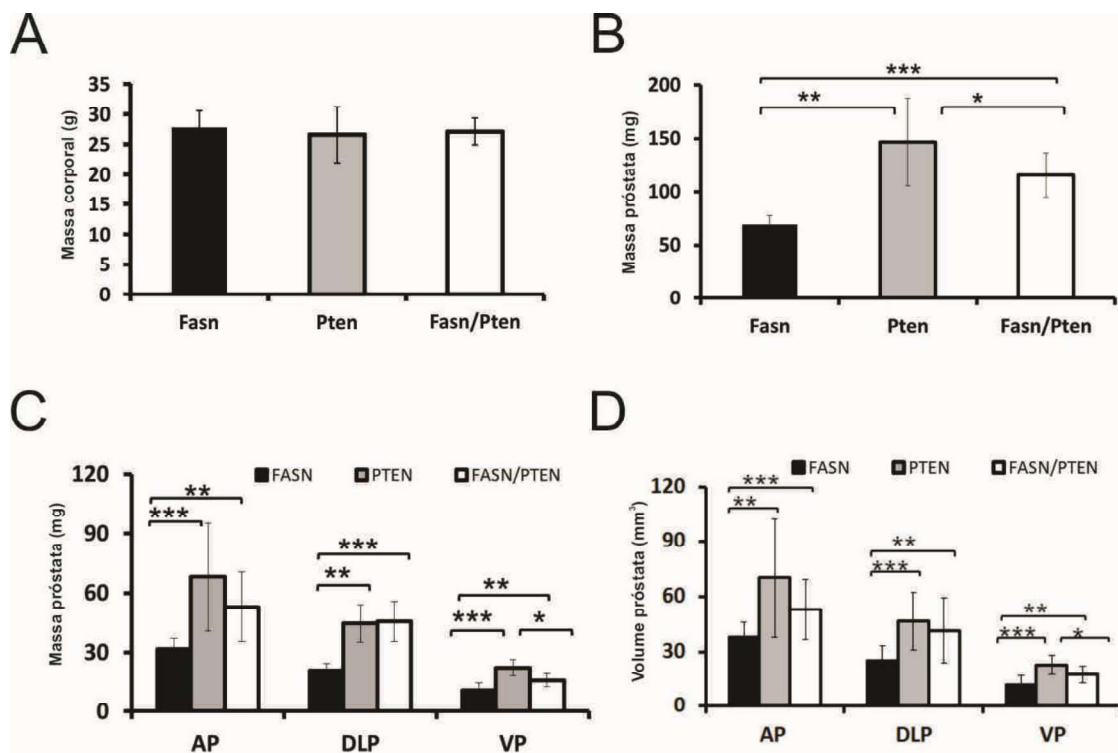
NOTA: Análise da expressão de FASN e Pten nos diferentes lobos da próstata de animais geneticamente modificados para ambos os genes. Expressão avaliada por imunohistoquímica com anticorpos específicos.

LEGENDA: Porcentagem de glândulas de diferentes lobos de próstata de camundongos KO para os genes *fasn* e *pten*. Observa-se uma maior eficiência na deleção do gene *pten* em relação ao gene *fasn*, com melhor eficiência do duplo KO nos lobos ventral e lateral.

Observa-se que o duplo knockout (KO) de *fasn* e *pten* ocorreu de forma mais eficiente nos lobos ventral e lateral. Para os dois grupos *Fasn*, o lobo dorsal mostrou uma menor taxa de recombinação.

A massa corporal, assim como a massa e volume da próstata desses camundongos também foram analisados (figura 17). Para os animais duplo KO de *fasn/pten*, a massa total da próstata foi menor se comparada com a do grupo *pten* KO. Além disso, tanto a massa quanto o tamanho do lobo ventral são menores se comparados ao grupo *pten* KO.

FIGURA 17 – MASSA E VOLUME DE PROSTATA DE CAMUNDONGOS KO PARA FASN, PTEN E FASN/PTEN



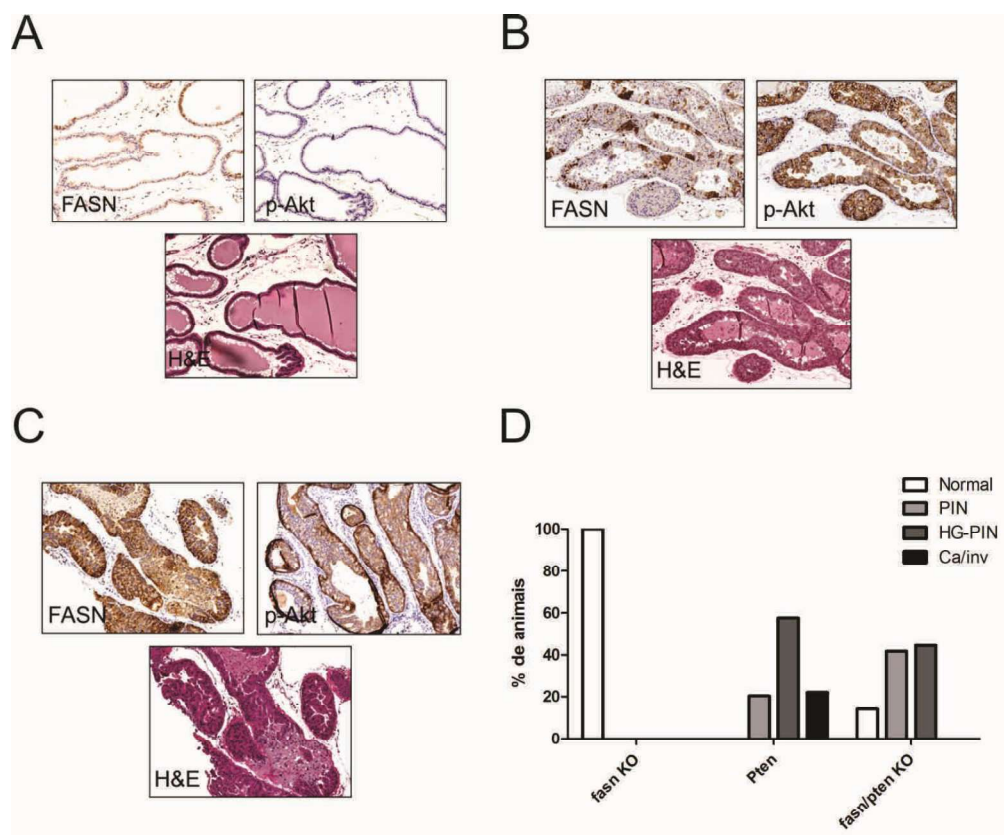
FONTE: O autor (2016).

NOTA: Análise da massa e de parâmetros dimensionais da próstata dos diferentes grupos experimentais de camundongos.

LEGENDA: A) massa corporal de camundongos KO para *fasn* (barras pretas), *pten* (barras cinza) e *fasn/pten* (barras brancas), expressa em gramas. B) massa total da próstata dos camundongos, expressa em miligramas. C) massa dos diferentes lobos da próstata: anterior (AP), dorsal/lateral (DLP) e ventral (VP), expressas em miligramas. D) volume dos diferentes lobos da próstata, anterior (AP), dorsal/lateral (DLP) e ventral (VP), expressos em mm³.

A análise histológica dos tecidos foi feita para os diferentes lobos da próstata dos três grupos de animais, e as alterações foram classificadas em normal, neoplasia intraepitelial de próstata (prostatic intraepithelial neoplasia, PIN), neoplasia intraepitelial de próstata de alto grau (HG-PIN) e carcinogênese de próstata (PCa) (figura 18).

FIGURA 18 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DE PRÓSTATA DE CAMUNDONGOS KO PARA FASN, PTEN E FASN/PTEN



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Análise histológica da próstata dos animais de diferentes grupos experimentais.

LEGENDA: A) Imunohistoquímica de próstata de camundongo KO para *fasn*. B) Imunohistoquímica de próstata de camundongo KO para *fasn* e *pten*. C) Imunohistoquímica de próstata de camundongo KO para *pten*. D) Análise quantitativa dos resultados observados. Através dos resultados da imunohistoquímica as alterações fenotípicas foram classificadas em diferentes graus de invasividade: normal (barras brancas), neoplasia intraepitelial de próstata (PIN, barras cinza-claro), neoplasia intraepitelial de próstata de alto grau (HG-PIN, barras cinza-escuro) e carcinogênese de próstata (PCa, barras pretas). Para os ensaios de imunohistoquímica foram usados anticorpos anti-FASN, anti-pAkt e coloração hematoxilina e eosina.

É possível notar que não houve alteração dos tecidos para os animais que tiveram o gene *fasn* deletado, com 100% dos animais analisados apresentando resultado histológico normal nos tecidos da próstata. Como esperado, a deleção de *pten* gerou alterações consideráveis nos tecidos, levando 20% dos animais a desenvolver PIN, 58% a desenvolver HG-PIN e 22% a desenvolver PCa. No grupo em que ambos os genes *fasn* e *pten* foram deletados as alterações histológicas foram menos intensas se comparadas com o grupo *pten* KO, com 14% dos animais apresentando normalidade dos tecidos, 42% com PIN, 44% com HG-PIN e nenhum animal com alteração do tipo carcinogênica. Uma análise mais específica, dos lobos separadamente, mostrou que o lobo ventral é o que mais sofreu alteração, pois apresentou o maior número de PCa em *pten* KO, caindo para 0% no grupo *fasn/pten* KO, com a maioria dos casos, 80%, em PIN e os 20% restantes em HG-PIN.

5. DISCUSSÃO

5.1. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE USP2a6His

A clonagem e expressão de USP2a6His se mostraram eficientes, essa última ocorrendo em corpos de inclusão. Pela sequência de aminoácidos da proteína verifica-se que ela é considerada hidrofílica, uma vez que seu índice GRAVY (Grand Average Hydropathicity), calculado pela soma dos valores de hidrofobicidade dos aminoácidos da cadeia polipeptídica dividido pelo número de resíduos de aminoácidos, é de -0,625 (KYTE et al., 1982). Entretanto, quando se expressa uma proteína em células bacterianas, é bastante comum que ocorra a formação de corpos de inclusão, mesmo quando a cadeia de aminoácidos produzida é tida teoricamente como hidrofílica. As células bacterianas não realizam todas as modificações pós-traducionais que uma célula eucariótica faz, podendo gerar um peptídeo bastante distinto do original, cujo enovelamento correto muitas vezes não ocorre, levando à produção de um agregado protéico insolúvel. Além disso, as células bacterianas são forçadas a expressar uma proteína exógena em grandes quantidades, facilitando a formação de corpos de inclusão (AUSUBEL et al., 2005; RUDOLPH et al., 1996). Essa expressão em corpos de inclusão não é de todo ruim, pode-se verificar que a quantidade de USP2a em relação às demais proteínas é muito maior, o que facilita a purificação da proteína uma vez que há menor número de contaminantes do que se observa no extrato de bactérias induzidas. Em outras palavras, apesar da desvantagem do uso de agente caotrópico para a solubilização dos corpos de inclusão, a presença da USP2a nestas estruturas funcionaria como um procedimento de pré-purificação frente aos demais constituintes protéicos da bactéria.

A proteína purificada foi eficiente na geração de anticorpos policlonais em camundongos, entretanto em coelhos o soro hiperimune obtido não foi capaz de reconhecer a proteína expressa em células de mamífero. Apesar de não haver sítios preditos de glicosilação na sequência de aminoácidos da USP2a (NetNGlyc 1.0 Server, CBS Software) a conformação da proteína recombinante pode esconder ou expor sítios que são importantes no reconhecimento da proteína expressa em sistema

eucariótico. O estabelecimento de uma linhagem de hibridoma secretora de anticorpos monoclonais não foi possível, devido à instabilidade dos clones obtidos. Sabe-se que células de hibridomas são instáveis, e algumas não só deixam de secretar anticorpos, como entram em apoptose durante o cultivo celular. O fato de células de hibridomas serem poliploides pode ser um dos motivos da instabilidade dessas células (SROUBEK *et al.*, 2012). Tendo em vista a importância da ubiquitinase em processos celulares, a produção de um anticorpo reativo à essa proteína pode gerar um ambiente não adequado ao crescimento celular, levando as células secretoras à morte.

5.2. ESTABELECIMENTO DE LINHAGENS DE PRÓSTATA COM SUPEREXPRESSÃO DE USP2a E SILENCIADAS PARA STAM

A utilização de vetores de clonagem como o pBABE permite o empacotamento da sequência de interesse em partículas retrovirais a serem introduzidas no genoma de células de mamífero, gerando uma expressão permanente e estável do gene. Esses vetores também possuem genes de resistência a puomicina, higromicina e neomicina, permitindo a seleção de células de fato transformadas com o vetor, o que leva ao estabelecimento de uma população homogênea de células (MORGENSTERN & LAND, 1990; PATEL *et al.*, 2012). Com isso, a clonagem de USP2a selvagem e seu mutante cataliticamente inativo nesse vetor permitiram a obtenção de linhagens celulares de próstata que superexpressam a proteína. Sem a necessidade de se transfectar rotineiramente as células com lipofectamina, por exemplo, não só se economizam reagentes, mas se trabalha com níveis de expressão da proteína semelhantes entre si, aumentando a reprodutibilidade dos ensaios.

Além de superexpressão, vetores como o pRS (OriGene) permitem o silenciamento de genes ao introduzir sequências de shRNA através de retrovírus. Assim como descrito anteriormente, as células obtidas também podem ser selecionadas com antibióticos específicos, gerando populações estáveis e uniformes. Para este trabalho utilizou-se o vetor pRS com shRNA para STAM, gerando populações de células com baixa expressão dessa proteína.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS MOLECULARES DE USP2a

A interação de enzimas deubiquitinases com STAM já é bem conhecida, sabe-se que tanto USP8 quanto AMSH são capazes de interagir com a região SH3 tanto de STAM1 quanto STAM2 (TANAKA *et al.*, 1999; KATO *et al.*, 2000). Com base nesses dados, e sabendo-se da co-localização de USP2a com EEA1, um marcador de endossomos precoces (LIU *et al.*, 2013), pressupôs-se que essa enzima também seria capaz de interagir com STAM, o que ainda não foi completamente elucidado. Apesar de se observar na figura 13 que houve co-imunoprecipitação de STAM com USP2a em células LNCaP, esse resultado não foi posteriormente reproduzido com sucesso usando-se as mesmas células expressando permanentemente a deubiquitinase. Além disso, dificuldades na expressão de STAM impediram a superexpressão dessa proteína, o que poderia facilitar a observação da interação, uma vez que haveria mais STAM do que se utilizando apenas a expressão endógena da célula. O uso de mutantes de STAM nas reações de co-imunoprecipitação também ajudaria a elucidar se de fato a região SH3 estaria envolvida na interação com USP2a.

É sabido que a USP8 interage com a região SH3 de STAM através do sítio PX(V/I)(D/N)RXXKP, chamado de SBM (KATO *et al.*, 2000). A AMSH interage com a região SH3 de STAM através de regiões ricas em Prolina, PXXP, e regiões do tipo RXXK (TANAKA *et al.*, 1999; SIERRA *et al.*, 2010), sendo que a região SBM já foi identificada como a principal responsável em mediar essa interação (KATO *et al.*, 2000). Analisando-se a sequência de aminoácidos da USP2a humana verifica-se a presença de 6 regiões RXXK, curiosamente 3 delas são conservadas nessa deubiquitinase murina, chamada UBP69, o que nos leva a imaginar um papel importante para essa região, tendo em vista sua conservação evolutiva entre as espécies.

Considerando-se a importância dos processos de ubiquitinação e desubiquitinação, é de se esperar que eles também ocorram com os componentes protéicos da maquinaria de endereçamento da célula, os ESCRTs. Especificamente, tanto STAM quanto Hrs podem ser ubiquitinados, um processo essencial para localização intracelular e atividade dessas proteínas nos processos de endocitose,

sendo que a ubiquitinação de STAM é tida como responsável por regular o endereçamento de proteínas ubiquitinadas ao MVB (MIZUNO *et al.*, 2006; SIERRA *et al.*, 2010). De fato, ambos os componentes protéicos do ESCRT-0, STAM e Hrs, possuem uma região de interação à ubiquitina chamada UIM (Ubiquitin-Interacting Motif), que possui cerca de 15 aminoácidos e é necessária para que ocorra a ligação de ubiquitina às proteínas substrato (MIZUNO *et al.*, 2006). Entretanto o processo não parece ser o mesmo para ambas as proteínas, enquanto Hrs sofre poli-ubiquitinação, STAM parece sofrer apenas monoubiquitinação, e nos dois casos a deleção de UIM impede a marcação com ubiquitina dos substratos (KATZ *et al.*, 2002).

Apesar da interação de USP2a com STAM não ter sido confirmada, encontrou-se uma correlação entre ambas, relacionada com a ubiquitinação de proteínas dos ESCRTs. Pela figura 15 percebe-se que quando há a superexpressão de USP2a WT a ubiquitinação de STAM1 é aumentada em relação ao controle que não superexpressa a enzima. Esse resultado é contrário ao que se pensava inicialmente, pois a expressão de uma DUB deveria levar à redução na ubiquitinação do substrato, uma vez que nossa hipótese inicial era de interação direta entre USP2a e STAM. Entretanto, fica mais claro compreender se pensarmos em STAM não como um substrato direto de USP2a. Dados da literatura mostram que uma deubiquitinase que interage com STAM, a AMSH, quando superexpressa não altera a ubiquitinação de STAM1 ou Hrs, entretanto quando se faz a superexpressão do seu mutante cataliticamente inativo, verifica-se uma hiperubiquitinação de ambos os componentes do ESCRT-0. Quando a região RXXK da DUB mutada é alterada para AXXA, desfazendo a interação STAM-AMSH, verifica-se um retorno aos níveis de ubiquitinação de STAM e Hrs como observado para a enzima selvagem (SIERRA *et al.*, 2010). Uma possível explicação seria a atuação da USP2a em desubiquitar e, portanto, aumentar os níveis de uma E3 ligase que tem STAM como seu substrato/alvo, de modo que sua superexpressão geraria um aumento na marcação da proteína do ESCRT-0. A literatura também mostra que apesar da expressão do mutante de AMSH, a qual é incapaz de se ligar a STAM, levar a um aumento em sua ubiquitinação, isso não altera a quantidade de STAM na célula (SIERRA *et al.*, 2010). Isso também foi observado na superexpressão de USP2a, em que tanto a proteína selvagem quanto a cataliticamente inativa não alteraram o nível de

expressão de STAM em células RWPE-1 (fig 15). No conjunto os dados sugerem que a interação entre USP2a e STAM deve ser muito tênue ou mesmo inexistente nas condições experimentais aqui conduzidas e caso haja esta interação, a mesma atua mantendo a ubiquitina ligada a STAM. Outra possibilidade é que a USP2a atue indiretamente na manutenção do status ubiquitinado da STAM, por exemplo, estabilizando a ação de uma E3 ligase que tenha STAM como seu substrato.

5.4 RECICLAGEM DE EGFR EM CÉLULAS SILENCIADAS PARA STAM

Pelos resultados obtidos com as linhagens de próstata, tanto para LNCaP quanto para RWPE-1, verifica-se um aumento na taxa de degradação de EGFR após tratamento com EGF em células silenciadas para STAM1 em relação ao controle com shRNA Scramble. Em células embrionárias de fibroblastos murinos, a deleção gênica de STAM1 e STAM2 atrasa o processo de degradação de EGFR após estímulo com EGF, entretanto a expressão de apenas STAM1 ou de apenas STAM2 nessa linhagem não é suficiente para reestabelecer o fenótipo da célula selvagem, levando, na verdade, a uma taxa de degradação do receptor que se assemelha a do controle (KANAZAWA *et al.*, 2003). Primeiramente pode-se pensar que o resultado da literatura para fibroblastos murinos é contrário ao obtido com células de próstata, entretanto neste trabalho apenas shRNA para STAM1 foi utilizado, de modo que as células de próstata ainda expressam STAM2, e, nesse caso, o resultado obtido se assemelha bastante ao descrito por Kanazawa quando os fibroblastos tem a expressão apenas de STAM2 reconstituída por infecção com retrovirus. De fato, observa-se que STAM1 e STAM2 parecem compensar um a ausência de outro nesse processo de endocitose, de modo que o complexo Hrs-STAM1 tem um papel bastante similar ao do complexo Hrs-STAM2 (KANAZAWA *et al.*, 2003). A desubiquitinação do EGFR pela USP8, após estimulação com EGF, é comprometida quando os domínios RXXK são mutados, devido à redução na interação da deubiquitinase com STAM. Sabe-se que a USP8 possui em sua estrutura o domínio MIT (Microtubule interacting and transport), que interage com componentes proteicos dos endossomos tardios, como CHMP-1A/B, e mutações nesse domínio não levam à

diminuição na ubiquitinação do receptor, indicando a importância de componentes do ESCRT-0, principalmente STAM, na reciclagem do receptor (BERLIN *et al.*, 2010).

Em linhas gerais, quando ambas as proteínas STAM1 e STAM2 são deletadas, a degradação de EGFR é reduzida, provavelmente por comprometer o tráfego do receptor pelos endossomos até chegar ao MVB, onde seria degradado. A presença de apenas uma delas, porém, como visto nesse trabalho, acelera a degradação do receptor. Isso também ocorre quando domínios de interação de DUBs-STAM são mutados, por impedir ou reduzir a taxa com que as deubiquitinases chegam aos endossomos para resgatar o receptor.

Uma diferença facilmente observada, porém, é que em LNCaP com cerca de 30 minutos de tratamento com EGF o receptor já quase não é detectado. Para células RWPE-1, assim como observado na literatura com as células embrionárias de fibroblastos e mesmo com células HeLa, verifica-se a presença de EGFR em tempos maiores do que uma hora de tratamento (KANAZAWA *et al.*, 2003; BERLIN *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013). Entretanto essa diferença pode ser devido a menor quantidade de EGFR em células LNCaP, como pode-se perceber comparando os tempos iniciais dos tratamentos, de modo que mesmo uma pequena degradação leve a uma quantidade de receptor não detectável pelo anticorpo.

5.5 INIBIÇÃO GENÉTICA DA ENZIMA ÁCIDO GRAXO SINTASE (FASN)

PTEN (Phosphatase and tensin homolog) é uma proteína supressora tumoral capaz de regular a progressão do ciclo celular e também a sobrevivência da célula, e sua expressão é comumente reduzida em diversos tipos de tumores (XIAO *et al.*, 2016). Já a enzima FASN tem um papel central na síntese de ácidos graxos pela lipogênese de novo (LDN), catalisando a produção de palmitato a partir de acetil-CoA e malonil-CoA, sendo essa a via de síntese de ácidos graxos usada por 95% dos tumores (GRANER *et al.*, 2004). Sabe-se que em tumores gástricos a expressão de FASN é maior do que a de tecidos gástricos normais, inclusive daqueles adjacentes ao tumor, enquanto a expressão de PTEN é menor. Além disso, uma maior expressão da enzima se correlaciona com aumento de metástase e disseminação peritoneal do tumor

(XIANG *et al.*, 2015). Os resultados obtidos para os animais em que houve deleção dos genes *fasn/pten* mostram que houve uma melhora no fenótipo tumoral em relação ao grupo em que houve apenas a deleção do gene *pten*. Considerando o papel crítico da FASN para a sobrevivência das células tumorais esse resultado é esperado, pois barra a principal via de síntese de ácidos graxos da célula. A literatura descreve essa relação entre FASN e PTEN também em outros tipos de tumores, como carcinoma de células do fígado, onde a perda total de PTEN foi correlacionada com aumento da expressão de FASN, além de um pior prognóstico da doença (ZHU *et al.*, 2012).

Outros estudos evidenciam que o oposto também é verdadeiro, a expressão de PTEN em células renais de ratos inibe significativamente a expressão de genes relacionados à lipogênese, como o gene que codifica para FASN, atenuando o fenótipo tumoral (HAO *et al.*, 2011).

Quanto à eficiência de obtenção de animais duplo KO para *Pten* e *Fasn*, e KO para *Fasn*, observa-se que ambas foram mais baixas que a do grupo *Pten* KO. Isso pode ter ocorrido devido à proximidade de inserção do gene *Cre* ao gene *Fasn* no cromossomo 11, que estão separados por apenas 300 pb. Essa inserção próxima pode ter sido a causa de haver um padrão quimérico na expressão de FASN no tecido da próstata.

Em geral os resultados sugerem que FASN, assim como USP2a, pode ser um importante alvo farmacológico para o tratamento de diferentes tumores, incluindo o tumor de próstata.

6. CONCLUSÃO

A clonagem, expressão e purificação da deubiquitinase USP2a foi realizada com sucesso, gerando uma proteína eficiente na geração de anticorpos policlonais murinos e possível de ser usada em ensaios diversos, como ELISA e pull-down. A obtenção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais, porém, não foi conseguida devido à instabilidade dos clones isolados.

A interação da USP2a com componentes protéicos do ESCRT-0, como STAM1, não foi completamente estabelecida. Apesar de um indício da interação ter sido observado em ensaio de co-imunoprecipitação, esse resultado não foi repetido em outros modelos testados. Entretanto a deubiquitinase parece modular o nível de ubiquitinação de STAM1, sem aumentar a degradação dessa proteína, indicando um papel na manutenção do status ubiquitinado de STAM1.

O silenciamento de STAM1 acelera a taxa de degradação do receptor de EGF em células normais e tumorais de próstata, o que deve estar envolvido com o desequilíbrio dos complexos Hrs-STAM1 e Hrs-STAM2, que parecem atuar em conjunto compensando suas funções.

O fenótipo carcinogênico observado em tumores de próstata de camundongos com deleção do gene *Pten* é menos agressivo quando o gene *Fasn* também é deletado, evidenciando o importante papel dessa enzima na sobrevivência das células tumorais, e sua importância como alvo terapêutico para diferentes tipos de tumores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLENDE-VEGA, N., *et al.* MdmX is a substrate for the deubiquitinating enzyme USP2a. **Oncogene**, v. 29. n. 3, p. 432-441, 2010.

BACHE, K. G.;SLAGSVOLD, T.;STENMARK, H. Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. **EMBO J**, v. 23. n. 14, p. 2707-2712, 2004.

BAEK, S. H., *et al.* Molecular cloning of a novel ubiquitin-specific protease, UBP41, with isopeptidase activity in chick skeletal muscle. **J Biol Chem**, v. 272. n. 41, p. 25560-25565, 1997.

BEDARD, N., *et al.* Mice lacking the USP2 deubiquitinating enzyme have severe male subfertility associated with defects in fertilization and sperm motility. **Biol Reprod**, v. 85. n. 3, p. 594-604, 2011.

BENASSI, B., *et al.* MYC is activated by USP2a-mediated modulation of microRNAs in prostate cancer. **Cancer Discov**, v. 2. n. 3, p. 236-247, 2012.

BERLIN, I.;SCHWARTZ, H.;NASH, P. D. Regulation of epidermal growth factor receptor ubiquitination and trafficking by the USP8.STAM complex. **J Biol Chem**, v. 285. n. 45, p. 34909-34921, 2010.

CLAGUE, M. J.;URBE, S. Endocytosis: the DUB version. **Trends Cell Biol**, v. 16. n. 11, p. 551-559, 2006.

D'AZZO, A.;BONGIOVANNI, A.;NASTASI, T. E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. **Traffic**, v. 6. n. 6, p. 429-441, 2005.

DAVIET, L.;COLLAND, F. Targeting ubiquitin specific proteases for drug discovery. **Biochimie**, v. 90. n. 2, p. 270-283, 2008.

GOUSSEVA, N.;BAKER, R. T. Gene structure, alternate splicing, tissue distribution, cellular localization, and developmental expression pattern of mouse deubiquitinating enzyme isoforms Usp2-45 and Usp2-69. **Gene Expr**, v. 11. n. 3-4, p. 163-179, 2003.

GRANDIS, J. R., *et al.* Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor- mediated cell growth In vitro. **J Clin Invest**, v. 102. n. 7, p. 1385-1392, 1998.

GRANER, E., *et al.* The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. **Cancer Cell**, v. 5. n. 3, p. 253-261, 2004.

HAGLUND, K., *et al.* Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. **Nat Cell Biol**, v. 5. n. 5, p. 461-466, 2003.

HANPUDE, P., *et al.* Deubiquitinating enzymes in cellular signaling and disease regulation. **IUBMB Life**, v. 67. n. 7, p. 544-555, 2015.

HAO, J., *et al.* PTEN ameliorates high glucose-induced lipid deposits through regulating SREBP-1/FASN/ACC pathway in renal proximal tubular cells. **Exp Cell Res**, v. 317. n. 11, p. 1629-1639, 2011.

HERSHKO, A., *et al.* Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. **J Biol Chem**, v. 258. n. 13, p. 8206-8214, 1983.

HURLEY, J. H. The ESCRT complexes. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 45. n. 6, p. 463-487, 2010.

HURLEY, J. H.;EMR, S. D. The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 35. n., p. 277-298, 2006.

HURLEY, J. H.;LEE, S.;PRAG, G. Ubiquitin-binding domains. **Biochem J**, v. 399. n. 3, p. 361-372, 2006.

KANAZAWA, C., *et al.* Effects of deficiencies of STAMs and Hrs, mammalian class E Vps proteins, on receptor downregulation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 309. n. 4, p. 848-856, 2003.

KATO, M.;MIYAZAWA, K.;KITAMURA, N. A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP. **J Biol Chem**, v. 275. n. 48, p. 37481-37487, 2000.

KATZ, M., *et al.* Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. **Traffic**, v. 3. n. 10, p. 740-751, 2002.

KATZMANN, D. J.;BABST, M.;EMR, S. D. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. **Cell**, v. 106. n. 2, p. 145-155, 2001.

KIM, J., *et al.* The ubiquitin-specific protease USP2a enhances tumor progression by targeting cyclin A1 in bladder cancer. **Cell Cycle**, v. 11. n. 6, p. 1123-1130, 2012.

LITTLE, J. L.;KRIDEL, S. J. Fatty acid synthase activity in tumor cells. **Subcell Biochem**, v. 49. n., p. 169-194, 2008.

LIU, J., *et al.* Targeting the ubiquitin pathway for cancer treatment. **Biochim Biophys Acta**, v. 1855. n. 1, p. 50-60, 2015.

LIU, Z., *et al.* The ubiquitin-specific protease USP2a prevents endocytosis-mediated EGFR degradation. **Oncogene**, v. 32. n. 13, p. 1660-1669, 2013.

- LOVE, K. R., *et al.* Mechanisms, biology and inhibitors of deubiquitinating enzymes. **Nat Chem Biol**, v. 3. n. 11, p. 697-705, 2007.
- MAHUL-MELLIER, A. L., *et al.* De-ubiquitinating proteases USP2a and USP2c cause apoptosis by stabilising RIP1. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823. n. 8, p. 1353-1365, 2012.
- MARTINEZ-VILLARREAL, J., *et al.* Cell surface turnover of the glutamate transporter GLT-1 is mediated by ubiquitination/deubiquitination. **Glia**, v. 60. n. 9, p. 1356-1365, 2012.
- MIZUNO, E., *et al.* A deubiquitinating enzyme UBPY regulates the level of protein ubiquitination on endosomes. **Traffic**, v. 7. n. 8, p. 1017-1031, 2006.
- MORGENSTERN, J. P.; LAND, H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. **Nucleic Acids Res**, v. 18. n. 12, p. 3587-3596, 1990.
- MOSESSON, Y., *et al.* Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. **J Biol Chem**, v. 278. n. 24, p. 21323-21326, 2003.
- NIJMAN, S. M., *et al.* A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. **Cell**, v. 123. n. 5, p. 773-786, 2005.
- PATEL, A., *et al.* Creation and validation of a ligation-independent cloning (LIC) retroviral vector for stable gene transduction in mammalian cells. **BMC Biotechnol**, v. 12. n., p. 3, 2012.
- POLO, S.; PECE, S.; DI FIORE, P. P. Endocytosis and cancer. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16. n. 2, p. 156-161, 2004.
- PRIOLO, C., *et al.* The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis. **Cancer Res**, v. 66. n. 17, p. 8625-8632, 2006.
- SHAN, J.; ZHAO, W.; GU, W. Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation. **Mol Cell**, v. 36. n. 3, p. 469-476, 2009.
- SHI, Y., *et al.* Ubiquitin-specific cysteine protease 2a (USP2a) regulates the stability of Aurora-A. **J Biol Chem**, v. 286. n. 45, p. 38960-38968, 2011.
- SIBILIA, M., *et al.* A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. **EMBO J**, v. 17. n. 3, p. 719-731, 1998.
- SIERRA, M. I.; WRIGHT, M. H.; NASH, P. D. AMSH interacts with ESCRT-0 to regulate the stability and trafficking of CXCR4. **J Biol Chem**, v. 285. n. 18, p. 13990-14004, 2010.

SORKIN, A.;VON ZASTROW, M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3. n. 8, p. 600-614, 2002.

SROUBEK, J., *et al.* The use of Bcl-2 over-expression to stabilize hybridomas specific to the HERG potassium channel. **J Immunol Methods**, v. 375. n. 1-2, p. 215-222, 2012.

STEVENSON, L. F., *et al.* The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2. **EMBO J**, v. 26. n. 4, p. 976-986, 2007.

TAKESHITA, T., *et al.* Cloning of a novel signal-transducing adaptor molecule containing an SH3 domain and ITAM. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 225. n. 3, p. 1035-1039, 1996.

TANAKA, N., *et al.* Possible involvement of a novel STAM-associated molecule "AMSH" in intracellular signal transduction mediated by cytokines. **J Biol Chem**, v. 274. n. 27, p. 19129-19135, 1999.

WANG, C. L., *et al.* Ubiquitin-specific protease 2a stabilizes MDM4 and facilitates the p53-mediated intrinsic apoptotic pathway in glioblastoma. **Carcinogenesis**, v. 35. n. 7, p. 1500-1509, 2014.

WILEY, H. S.;BURKE, P. M. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. **Traffic**, v. 2. n. 1, p. 12-18, 2001.

WOLLERT, T.;HURLEY, J. H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. **Nature**, v. 464. n. 7290, p. 864-869, 2010.

WRIGHT, M. H.;BERLIN, I.;NASH, P. D. Regulation of endocytic sorting by ESCRT-DUB-mediated deubiquitination. **Cell Biochem Biophys**, v. 60. n. 1-2, p. 39-46, 2011.

XIANG, H. G., *et al.* Expression of Fatty Acid Synthase Negatively Correlates with PTEN and Predicts Peritoneal Dissemination of Human Gastric Cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16. n. 16, p. 6851-6855, 2015.

XIAO, J., *et al.* PTEN expression is a prognostic marker for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of the literature. **Oncotarget**, v. n., p., 2016.

YAMADA, M., *et al.* Loss of hippocampal CA3 pyramidal neurons in mice lacking STAM1. **Mol Cell Biol**, v. 21. n. 11, p. 3807-3819, 2001.

YE, Y., *et al.* Dissection of USP catalytic domains reveals five common insertion points. **Mol Biosyst**, v. 5. n. 12, p. 1797-1808, 2009.

ZHU, X., *et al.* Combined phosphatase and tensin homolog (PTEN) loss and fatty acid synthase (FAS) overexpression worsens the prognosis of Chinese patients with hepatocellular carcinoma. **Int J Mol Sci**, v. 13. n. 8, p. 9980-9991, 2012.

